

PhD értekezés

**Diffúzió és relaxáció heterogén közegben -  
Mágneses rezonancia vizsgálatok biológiai modelleken**

Kotek Gyula



Szegedi Tudományegyetem  
Fizika Doktori Iskola

2008

„A valóságból absztrakció útján a törvényhez, a törvényektől vissza  
ismét a valósághoz: ez az a kör, amelyen a modern  
természettudománynak járnia kell.”

- Simonyi Károly: A fizika kultúrtörténete

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
Bevezető.....	5
Diagnosztikai aspektusok.....	6
Biológiai és biofizikai aspektusok.....	8
A vizsgált anyag általános fizikai tulajdonságai .....	10
Előzmények, irodalmi áttekintés .....	13
A víz diffúziójának egyszerű elméleti modellje.....	13
Heterogén közegek diffúziójának EMT modellje .....	20
Porózus közeg – relaxáció hatása.....	26
Transzverzális relaxáció – helyfüggő Larmor frekvencia.....	33
Karakterisztikus hossz, $q$ -space.....	34
Célkitűzés .....	37
Motiváció .....	39
Intracelluláris crowding.....	41
Proteolízis modell.....	42
Intra és extracelluláris tér hatása az MR jelintenzitásban .....	45
Intracelluláris tér módosulásainak hatása a diffúziós és relaxációs paraméterekre .....	46
Eszközök és módszerek.....	48
MR technikák .....	48
Oldatok .....	52
VVT szuszpenzió .....	54
Intracelluláris tér módosulásai .....	56
Eredmények.....	58
Proteolízis modell.....	58
Ozmotikus rezisztencia – diffúzió.....	65
IC és EC tér független vizsgálata – VVT szuszpenzió.....	68
Intracelluláris tér módosulásai .....	77
Diszkusszió, további lehetőségek.....	81
Köszönetnyilvánítás .....	87
Irodalomjegyzék.....	89
Összefoglaló .....	95

## Rövidítések jegyzéke

ADC – Látszólagos Diffúziós Együttható (Apparent Diffusion Coefficient)

$b$ -érték – diffúziós MR kísérletekben a jelcsökkenés exponense (kísérleti paraméterek függvénye)

CPMG – Carr-Purcell-Meiboom-Gill (szerzők nevéből alkotott MR szekvencia elnevezése)

DWI – Diffúzió súlyozott kép (Diffusion Weighted Image)

EC – Extracelluláris

EMT – Effektív Közeg Elmélet (Effective Medium Theory)

IC – Intracelluláris

MR – Mágneses Rezonancia (Magnetic Resonance)

MRI – Mágneses Rezonancia Képalkotás (Magnetic Resonance Imaging)

PFGSE – Pulsed Field-Gradient Spin Echo

T2WI – T2 súlyozott kép (T2 Weighted Image)

T1WI – T1 súlyozott kép (T1 Weighted Image)

VVT – vörösvértest

## Bevezető

A diagnosztikai MR képalkotás a mai radiológia egyik legfejlettebb eljárása. A rendelkezésre álló technológia lehetővé teszi a széleskörű klinikai alkalmazást. Az MR képalkotás során a mérési paraméterek száma nagyobb, mint egyéb transzmissziós röntgen eljárás esetén (pl.: CT). Azon anyagi jellemzők száma is nagyobb, amelyek az MR jelintenzitást befolyásolják. Az MR mérések széles skálán nyújtanak lehetőséget szövetek jellemzésére, azok közötti kontraszt előállítására. Ugyanakkor rendkívül sok kérdés merül fel a mérési paraméterek megválasztása, illetve a mérési eredmények értelmezése során. Jól példázzák ezt az MR diffúziós mérések. Az MR diffúziós mérések alapja rendkívül egyszerű, de a gyakorlati alkalmazás alapos szakértelmet követel meg. Hogyan válasszuk meg a *b*-értéket, hogyan állítsuk be a gradiens irányát, mi az ADC (Apparent Diffusion Coefficient – látszólagos/mért/effektív diffúziós tényező) jelentése valójában, hogyan állítsuk be a diffúziós időt, milyen szekvenciát használjunk, milyen hatással van a relaxáció a mérésre, mi az eddy áram hatása a mérésre?

A mérési eredmények és a hozzájuk tartozó kóros elváltozások párosítása mára hatalmas adatbázist épített fel, köszönhetően annak, hogy az MR képalkotás egyre szélesebb körben érhető el. Az ismeretek ilyen módon való felhalmozódása jelenleg még mindig expanzív stádiumban van, a részletekben való elmélyülés még sok klinikai területen várat magára. Ennek az oka főleg az, hogy a patológiák MR képalkotásbeli megjelenésének értelmezése rendkívül bonyolult lehet. A mért rendszer (élő szövetek) minden szempontból összetett. A mérési paraméterek megválasztása kijelöli azt a tér-, idő-, és energiaskálát, amelyen lezajló folyamatok befolyásolják a mérési eredményt. Ez lehetőséget nyújt arra, hogy a rendkívül összetett élő rendszerben (amelyben minden ismert részlet fontos funkcióval bír) elhanyagolásokkal élhessünk. Olyan részletektől kell eltekintenünk, amelyek az adott mérési skálán, illetve mérés érzékenységén túl nem játszanak szerepet. Az egyszerűsítés, elhanyagolás során azonban szem előtt kell tartani az ilyen módon kapott eredmények érvényességi határait.

Számos patológia esetében nyílhat lehetőség árnyaltabb információ megszerzéséhez azáltal, hogy az MR mérések eredményeit befolyásoló jelenségeket tisztázzuk. Az MR diagnosztikát érintő kutatások az általánosan elfogadott paradigmák folytonos megújulásához vezetnek, a folyamatos technológiai fejlődés mellett a mérési eredmények mikroszkopikus hátterének tisztázása folyik. Jól példázza ezt a folyamatot az ISMRM (International Society for Magnetic

Resonance in Medicine) 2006-ban kiadott „Outstanding Issues” (A kiemelkedően fontos ügyek) című levele, amely kitér az MR képalkotást érintő biofizikai kérdésekre:

„ ...

### ***DIFFUSION BIOPHYSICS***

9. *“Establish the definitive biophysical mechanism underlying the dependence of ADC on the b-value in the brain”.*

10. *“Understand why the trace of the diffusion tensor (at moderate bvalues) is nearly constant across brain tissue types and species”*

11. *“Definitively quantify the contributions of the intra- and extra-cellular components to the diffusion signal”*

12. *“Identify the cellular correlates of changes in diffusion anisotropy in white matter”*

13. *“Reliably quantify the dependence of diffusion on diffusion time, to identify different tissue types or geometrical features”*

14. *“Better understand the biophysical nature of diffusion MR signal, in order to optimize diffusion experiments more effectively”*

15. *“Identify all the causes of  $\lambda_2$  being greater than  $\lambda_3$  in a fiber”*

... „

Jelen dolgozat tárgyát elsősorban az intra-, és extracelluláris tér diffúziós jelcsökkenésben játszott szerepének tisztázása (ld. 11. pont fent), valamint az ezzel párhuzamba állítható relaxációs jelenségek képezik.

Vizsgálataink a stroke során felmerülő radiológiai probléma nyomán azt a célt tűzték ki, hogy ellenőrizhető modellkísérletekben a víz diffúziós tényezőjének és a T2 relaxációs időnek a kontrollálható paraméterektől való függését felderítsék. A vizsgálatok tárgyát kísérleti modell oldatok, illetve sejtek szuszpenziói képezték. A kísérleti eredmények elméleti modellekkel vettem össze, ennek célja: a) a modellek érvényességét tesztelni, b) a validált modellek alapján összetett rendszerekben bekövetkező diffúziós tényező és T2 relaxációs idő változásokat megjósolni, c) az MR mérések tér-, és időskáláját illetően koherens képet kialakítani, amely támpontot ad a diagnosztika szakemberei számára. Vizsgálataim középpontjában heterogén (intra-, és extracelluláris közeget is tartalmazó) rendszerek diffúziós és relaxációs tulajdonságai álltak. Az intra-, és extracelluláris tér oldott molekulái minőségének és mennyiségének hatását vizsgáltam.

### ***Diagnosztikai aspektusok***

A diffúziós MR képalkotás a központi idegrendszer betegségein kívül a vese, a máj és a nyirokcsomók elváltozásainak diagnosztikájában játszik szerepet. A vízmolekulák sejtmérettel összevethető távolságú elmozdulásának tanulmányozása fényt vet a víztranszportban bekövetkező változásokra, valamint a szövetek geometriai és térbeli elhelyezkedési

változásaira a kóros és egészséges állományok összehasonlításában. A relaxációs mérések ugyanakkor az oldott anyag koncentrációjának változásáról, illetve a vízkoncentrációk alakulásáról adnak információt. Részben technikai okok miatt a központi idegrendszer kóros elváltozásainak tanulmányozásában születtek az első MR diffúziós eredmények.

Az agytumrok diagnosztikájának területén a betegpopuláció viszonylag nagyszámú. Emellett a tumortérfogatok inhomogenitása, a tumor mellett megjelenő ödéma, műtéti beavatkozások hatása, kemoterápia hatása, cisztás léziók kialakulása, malignitásbeli különbségek, radioterápia okozta elváltozások olyan széles vizsgálati bázist teremt, amely lehetőséget teremt az MR technikák optimalizálására és a patológia-kontraszt összefüggések feltérképezésére (ld. [1]). A különböző szövettartományok diverzitása ugyanakkor kihívást is jelent a diagnosztika számára, hiszen a víz diffúziójának alakulása mögött egészen különböző biofizikai mechanizmusok állnak, sokszor (egy adott MR technika mellett) azonos kontrasztot eredményezve. A differenciáldiagnózis lehetősége több mérési MR technika alkalmazásának szükségességét is jelenti. A diffúziós tényező a cisztás és nekrotikus régiókban magasabb az egészségeshez képest. A vazogén eredetű ödémák szintén nagyobb diffúziós tényezőhöz vezetnek. Ugyanakkor a radioterápia okozta károsodások alacsonyabb ADC értékhez vezetnek. Staging szempontból talán legfontosabb a tumor grádusa és az ADC értéke közötti összefüggés. A tumor grádusának növekedésével az ADC érték kis mértékben növekszik, a tumor térfogatában az ADC érték az egészségeshez képest csökkent értéket mutat. Mivel a tumor és a radioterápiás károk ADC csökkenéshez vezetnek, e területek megkülönböztetése kontrasztanyag alkalmazásával lehetséges, a tumor állomány erezettsége az egészséges szövetektől eltérő, ezért a perfúziós tulajdonságában egyértelműen különbözik az egészséges állománytól [1]. A tumoros állományok patológiájukban jelentősen különbözhetnek, az ADC értékek is nagyon különbözőek lehetnek. E különbségek patomechanikája és ezen alapuló biofizikai háttere nem minden esetben tisztázott. A relaxációs mérések (T1WI, T2WI) a cisztás állományt nem minden esetben képes jó intenzitáskülönbséggel ábrázolni a DWI-hez képest, ennek oka a cisztás állományban esetenként felhalmozódó relaxáló ágensként működő fehérjék illetve fehérjeszármazékok magas koncentrációja [1]. Ez megmagyarázhatja a relaxációban bekövetkező csökkenést. Habár az ilyen jelenségekhez egyszerű és közérthető magyarázatok társultak a diagnosztikában, sokszor ellentmondásosak és esetenként félrevezetőek lehetnek.

A diffúzió súlyozott képalkotás másik nagy alkalmazási területe az agyérbetegségek diagnosztikája, a stroke, az ischémiás állományok vizsgálata. A DWI alkalmazásának egyik fő oka (a szintén nagy számú betegpopuláció mellett) az, hogy a diffúziós képalkotásban az

ischemiás terület merőben más információt nyújt mint a T2 súlyozott képeken. A stroke kialakulásának első óráiban a relaxáció az érintett területen nem változik, ugyanakkor az ADC értéke jelentősen csökken, így a DW képeken az érintett terület nagy jelintenzitású. A T2 érték csak órák múlva nő meg, miközben ödéma alakul ki, ez a T2 súlyozott képeken nagyobb jelintenzitáshoz vezet. Az ADC értéke később növekszik, mint ahogyan a T1 érték is. Ez a csökkenés a szürkeállományra jellemző, a fehér állományt nem érinti. Az állatkísérletek hasonló, azonnali postmortem ADC csökkenést mutatnak. További állatkísérletek hasonló jelenséget igazoltak indukált fokális agysérülések esetén [1].

Érdemes megjegyezni, hogy a kontrollált és reprodukálható állatkísérletek azt igazolják, hogy az ischemia utáni első 1-2 percben az ADC érték átmeneti növekedést mutat (10-20%) az érintett területen, mielőtt a csökkenő tendencia mutatkozna [1]. Ez a jelenség a reperfúziós folyamattal jól korrelál, ugyanakkor ez a korreláció megszűnik hyperglikémiás állatokban. Ez a kísérleti eredmény rámutat az élettani folyamatok bonyolultságára.

Több mechanizmus sejthető a jelenség mögött. Szöveti szinten citotoxikus ödéma kialakulása, később megnövekedett szöveti víztartalom léphet fel. Mikroszkópikus szinten víz áthelyeződése az extracelluláris térből az intracelluláris térbe, sejtmembrán víz-permeabilitásának megváltozása, extracelluláris térben molekuláris crowding, intracelluláris térben ozmotikusan aktív víz felszaporodása, és a vízmolekulák számára diffúzió által elérhető térfogatok geometriájának megváltozása (tortuosity) az MR jelintenzitást befolyásolják. Továbbá a sejtek ozmotikus rezisztenciájában beálló változások szerepe is felmerül. Ezek a folyamatok időben nem egyszerre történnek, ugyanakkor ok-okozati összefüggésben állnak, állhatnak egymással. Az MR jelekben az intracelluláris és extracelluláris tér hatása direkt módon nem választható szét. Az állatmodell kísérletekben az ischemia előidézésére számos technikai megoldás kínálkozik, ezek azonban több egyidejű élettani hatással járnak, amelyek tovább bonyolítják a patológias történések megértését. A sejtszintű történések tisztázására a szövetmodelleken végzett kísérletek adhatnak segítséget. Az összetett jelenség tisztázása segítséget nyújt a károsodott térfogat meghatározása, a károsodás előrehaladása diagnózisában, valamint a terápiás eljárások meghatározásában.

## ***Biológiai és biofizikai aspektusok***

A biológiai rendszerekben a víz tulajdonsága meghatározó szerepet tölt be. Az, hogy a víz sejten belül egyszerű folyadékként viselkedik, vagy úgy, mint egy egyszerű vizes oldatban, esetleg ezektől alapvetően különböző tulajdonságokkal bír, élénk viták tárgyát képezte az



elmúlt évtizedekben [2]. A víz nem egyszerűen makromolekulák oldószere, hanem transzportfolyamatok közege is, mint ahogyan a makromolekulák nem egyszerűen oldott anyagok, hanem szerkezetük, kölcsönhatásuk révén összetett funkcionális szerkezetként viselkednek. A mechanikus, diffúzió által vezérelt transzportfolyamat-modellek csak korlátozottan érvényesek [2]. A víz, mint egyszerű folyadék fizikai tulajdonságai is különösek. A víz sűrűsége 4 °C-on a legnagyobb, a kompresszibilitása 46 °C-on a legnagyobb, viszkozitása csökken a nyomás növekedésével, szilárd formában kvázikristály. Ezen tulajdonságok különböző típusú, jéghez hasonló szerkezetű mikrodomének jelenlétével magyarázhatók, amelyek között a vízmolekulák gyorsan cserélődnek [2]. Ez a tulajdonság rendkívül fontossá válik oldott ionok, molekulák jelenlétében, ahol a hidratációs rétegek közötti szerkezeti különbségek, valamint az ezek közötti vízmolekula cserélődés fontos szerepet játszanak. A víz biológiai közegben tehát nem tekinthető homogén folyadéknak, inkább különböző típusú folyadékok dinamikus keverékének. A sejten belüli térben a víz koncentrációja kisebb, mint a sejten kívüli tartományban. Ezt a koncentrációkülönbséget (állati sejtekben) a sejtmembránok ionpumpák segítségével (mint pl.  $\text{Na}^+$  ionok intracelluláris térből való kipumpálása) tartják fent, amellyel indirekt módon a víz koncentrációkülönbségét igyekeznek fenntartani. Az ionpumpák ozmotikus regulációs szerepe nem feltétlenül egyedülálló. Az ozmotikusan inaktív víz mennyiségére vonatkozó tanulmányokból kiderül, hogy az intracelluláris víz nagy része a fehérjékkel kölcsönhatásban áll. A fehérjék konformációs változásai pedig a velük kölcsönhatásban álló víz mennyiségét befolyásolni képes. Ilyen módon az ozmotikusan inaktív (nem mobilis, nem kivonható) víz mennyisége is változik, ezzel mintegy a fehérjék ozmotikus regulátorként lépnek fel. Habár az ok-okozati összefüggés nem feltétlenül helytálló, az kijelenthető, hogy az intracelluláris makromolekulák konformációja és minősége, a vízmolekulák mozgékonyasága, a sejt ozmotikus viselkedése, valamint a metabolikus transzportfolyamatok között erős összefüggés található [2].

Az MR mérések térbeli felbontóképessége általában jóval gyengébb, mint a sejtméret (az extrém petesejt MR mikroszkópiás vizsgálatától eltekintve). Az MR mérések ezért legfeljebb a teljes intracelluláris átlagokat képesek mérni (sokaságra vett átlag), mint diffúziós tényező, illetve relaxációs állandó. A fent említett mikrodomének mérete a nm-es skálán van, ezért ezek jelenlétéről legfeljebb indirekt módon lehet igazolást, illetve cáfolatot nyerni. Az intra-, illetve extracelluláris vízterek különbsége, a sejtmembránok vízre vonatkozó permeabilitása szintén közvetett módon jelenik meg, alapos kísérleti tervezéssel, in-vitro modellkísérletekkel azonban az MR mérésekre gyakorolt hatásuk meghatározható. Valójában az MR mérések adnak lehetőséget arra, hogy a vízmolekulák mozgékonyaságát in-vivo módon, élő intakt

sejtben mérni lehessen. A relaxációs mérések közvetetten ugyan, de a vízmolekulák tartózkodási helyéről és tartózkodási idejéről adnak információt, hiszen a relaxáció mikroszkopikus jelensége rövidtávú kölcsönhatásokon (dipólus-dipólus, dipólus-kvadropólus, amelyek árnyékolás nélkül is gyorsan térben lecsengő kölcsönhatások) keresztül érvényesül.

A sejtek ozmotikus reakciójának feltérképezése, a vízmolekulák mozgékonyasága, valamint a vízmolekulák tartózkodási helyének és tartózkodási idejének feltérképezése fontos információval szolgál olyan kóros folyamatok megértéséhez, mint a citotoxikus ödéma, a sejtek ozmotikus reakciója, vagy a sejtciklussal kapcsolatos intracelluláris történések. Mindezek az ismeretek az MR mérési eredmények előrejelzését szolgálhatják, ezzel teremtve meg az MR képalkotásbeli megjelenés és az élettani folyamatok közötti kapcsolatot.

### ***A vizsgált anyag általános fizikai tulajdonságai***

A biofizikai modellezéshez elengedhetetlenül szükséges a vizsgált biológiai szövetek általános fizikai tulajdonságainak ismerete. A vizsgált szövetek biológiai, kémiai és fizikai tulajdonságai rendkívül összetettek, és ezen aspektusok szerint nem is mindig tárgyalhatók külön-külön. Mégis szükségesnek látszik, hogy biofizikai szempontból vizsgáljuk a mérés tárgyát képező rendszereket. E szempont szerinti tárgyalás ugyan durván leegyszerűsítőnek tűnhet egy biokémikus, illetve egy orvos számára, ugyanakkor lehetőséget ad egyszerű modellek felállítására, azok tesztelésére és korrekciójára. Nem utolsósorban e modellek érvényességi határait is világosan meg lehet határozni. E modellek olyan egyszerű paraméterekkel foglalkoznak, mint például oldott anyagok koncentrációja, víztartalom, a sejtmembrán áteresztőképessége, oldott anyagok molekuláinak tömege, fizikai dimenziói, sejtek mérete stb. Amennyiben e paraméterek változása kóros folyamatokban jól feltérképezett, úgy az élettani, szövettani ismeretek fontos információkkal szolgálhatnak a fizikai-kémiai modellekhez.

Az élő szövetek fizikai tulajdonságainak leírása nem egyszerű feladat. A gáz halmazállapotú anyagok tulajdonságainak leírásában a termodinamika eszköztára rendkívül sikeres, a szilárd testek esetében a szilárdtestfizika nyújt segítséget. Ez a két példa két szélsőséges esetet jelent. A gázok esetében az alkotóelemek átlagos kinetikus energiája jóval nagyobb az átlagos potenciális energiájuknál. A szilárd testekben éppen az alkotó elemek közötti kölcsönhatásból származó potenciális energia az, ami a rendszer egészének viselkedését meghatározza. E két extrémum esetében elhanyagolásokkal élhetünk, a gázok esetében a potenciális energiát, a szilárd testek esetében a kinetikus energiát illetően. Ezek az elhanyagolások útján a fizikai

menyiségek olyan viszonylag egyszerű összefüggéseihez juthatunk, amelyek az anyag viselkedését széles érvényességi határok között jól írják le (gáztörvények, fajhő, elektromos vezetőképesség, általánosan a lineáris transzportfolyamatok leírása)<sup>1</sup>. Ezen elhanyagolások érvényességi határaihoz érve bizonyos korrekciókkal élve az összefüggések is korrigálhatók (reális gázok, phononok, diszlokációk viselkedése kristályos anyagokban). A biológiailag fontos anyagok esetében azonban inkább folyadék halmazállapotról beszélhetünk (legalábbis ami a kinetikus energia és a potenciális energia viszonyát illeti). A folyadékok esetében a fent említett elhanyagolásokkal nem élhetünk. Éppen a helyhez kevésbé kötött (a szilárd testek alkotóelemeihez képest) alkotóelemek közötti kölcsönhatás az, ami kémiai és végső soron biológiai szempontból érdekessé teszi ezt a halmazállapotot. A folyadékok elméleti modellezése merőben más megközelítést igényel, mint a szilárd testek, illetve gázok leírása. Egymással kölcsönhatásban álló alkotóelemekből álló sokaságok sztochasztikus, kollektív viselkedését kell modellezni. Tovább nehezíti a leírást, hogy a kölcsönhatások irreverzibilis folyamatokhoz vezetnek, az egyensúlyi termodinamikai megfontolások csak korlátozottan alkalmazhatók (viszkozitás, memória, többrészesek ütközések). Biológiai anyagokat illetően említést kell tenni a folyadékok makroszkopikus tulajdonságait meghatározó folyamatok időskálájáról is. A sztochasztikus rendszerekben az elméleti modellek sokszor feltételezik a rendszer ergodicitását. A matematikai leírásban, ez abban nyilvánul meg, hogy az időátlag és sokaságra vett átlag azonos. A diffúziós folyamatokat illetően ez azt jelenti, hogy egy részecske (vízmolekula, oldott makromolekula, membránban lipidmolekula stb.) a számára lehetséges teret, állapotokat bejárja (az erre minimálisan felhasznált idő pedig elhanyagolható a leírni kívánt folyamathoz képest). Ez a feltétel távolról sem teljesül automatikusan a rendkívül mozgékony vízmolekulákra egy MR diffúziós mérés esetében, ahol a diffúziós idő kb. 20-40 ms (többek között a sejtmembránok véges permeabilitása miatt).

Az előzőekben említett elméleti problémák szempontjából érdemes néhány megjegyzést tenni az MR mérésekkel kapcsolatban:

- A legelterjedtebb MR képalkotás proton rezonanciára, azaz vízjelre épül. A víz az élő szervezetben leginkább folyadékként értelmezendő, az MR képalkotás folyadék MR eljárás (a szilárd állapotú anyagból származó jel elhanyagolható az MR diagnosztikában).

---

<sup>1</sup> A leírások lehetnek fenomenológiai leírások, vagy mikroszkopikus modelleken alapulók. A mikroszkopikus leírás a fenomenológiai modellt alátámasztja, illetve érvényességi határát jelöli ki.

- A relaxációs folyamatok ( $T_1$ ,  $T_2$ ) a víz és a rendszer egyéb alkotóelemei közötti kölcsönhatások kollektív viselkedésének eredménye.
- A diffúzió olyan transzportfolyamatként értelmezhető, amely a relaxációs helyekre szállítja a vízmolekulák protonjait. A relaxáció és a diffúzió erősen kapcsolódó folyamatok.
- Az MR mérések makroszkopikus mérések, a mérési eredmények sokaságra vett átlagértékeként értelmezhetők.
- Az MR mérések időskáláján az ergodicitás nem teljesül magától értetődően. Az MR mérések időskálája valamint a sejtes állományban előforduló vízmolekulák transzport folyamatai időskálájuk szerint nem választhatók külön.

## ***Előzmények, irodalmi áttekintés***

Az elmúlt évtizedekben számos tanulmány tárgyát képezte a folyadékok heterogén közegben való diffúziója. E tanulmányok motivációi egymástól merőben eltérők. A porózus közetek folyadéktartalmának áramlási tulajdonságait a geofizika, végső soron a petrofizikai ipar kutatja (kőolaj és földgázkutatások, természetes gáztározók). A polimerek tulajdonságaival kapcsolatos kutatásokat, az összetett folyadékokkal kapcsolatos kutatásokat az új anyagok (műanyagok, ipari felhasználású folyadékok) fejlesztésének igénye támogatja. A biológiai rendszerek esetében e kutatásokat a biológiai alapkérdések tisztázása (szövetek tulajdonságai, sejtszerkezet, transzportfolyamatok) ösztönzi. Ugyanakkor az orvosi területen a biológiai kutatások az élettani folyamatok értelmezésében közvetlen segítséget nyújtanak. Az orvosi területen az MR diffúziós mérések eredményeinek értelmezése ösztönzi e kutatásokat. Jelen tanulmány fókuszában ezen értelmezési problémák állnak.

A folyadékok diffúziós viselkedésének in-situ tanulmányozására az MR diffúziós mérések bizonyulnak a leghatékonyabbnak. A fent említett kutatási területeken alkalmazott MR berendezések felépítésükben (zárt, illetve nyitott MR mérési tér) és műszaki paramétereiket tekintve (térerősség, gradiens erőssége, gradiens duty-cycle tartomány, mérések időtartama, mint pl. diffúziós idő) jelentősen különbözhetnek, ugyanakkor a kísérletek eredményeként megszülető, verifikált elméleti modellek kölcsönösen felhasználhatók. Így pl. a porózus közetek kutatási eredményei a heterogén biológiai szövetek tanulmányozásában is felhasználhatók.

Az elméleti modellekben meghatározó probléma a Brown-mozgás számára rendelkezésre álló tér heterogenitása és geometriája, függetlenül a kísérleti modellrendszerektől.

## **A víz diffúziójának egyszerű elméleti modellje**

*Nagyon rövid diffúziós idő – gyors diffúzió:  $\Delta \rightarrow 0$*

A heterogén közeg teljesen új problémákat vet fel. Az, hogy a vízmolekulák (amelyek az MR jeleket szolgáltató protonok fő hordozói) hogyan diffundálnak az alapvetően heterogén szövetmodellekben, analitikus és numerikus módon is tanulmányozható [3]. Az MR mérésekből származó eredmények az MR mérés térbeli felbontóképessége miatt sokaságra vett átlagként értelmezhetők. Az így nyert diffúziós tényezőt ezért látszólagos diffúziós tényezőnek nevezzük (ADC - Apparent Diffusion Coefficient). Az ADC standard mérési módszere a PGSE MR szekvencia (Pulsed Gradient Spin Echo). Az így nyert MR jelet a T2

relaxáció terheli. Az egyszerű tárgyalás miatt ettől érdemes első lépésben eltekinteni. Az analitikus tárgyalás három időtartomány szerint tehető meg. Nagyon rövid infinitezimális  $\Delta$  (diffúziós idő), rövid és hosszú  $\Delta$ . Az elhanyagolhatóan rövid  $\Delta$  melletti mérés esetén feltételezhető, hogy a különböző tértartományokba eső vízmolekulák (IC - intracelluláris, EC - extracelluláris) a mérés ideje alatt a szóban forgó tartományt nem hagyják el, végig itt tartózkodnak, a sejtmembránokon nem lépnek át. Az összes  $N$  molekulából  $N_I$  az IC-ben,  $N_E$  az EC-ben tartózkodik. Az átlagos (sokaságra vett) elmozdulás négyzete az IC és EC kompartmentek részpopulációival súlyozva kifejezhető, mint a mérés diffúziós idejének ( $\Delta$ ) függvénye:

$$\langle X^2(\Delta) \rangle = \frac{N_I}{N} \langle X^2(\Delta) \rangle_I + \frac{N_E}{N} \langle X^2(\Delta) \rangle_E. \quad (1)$$

Ez az összefüggés egy igen egyszerű és használható, éppen ezért széles körben elterjedt képlethez vezet, feltéve, hogy az víz koncentrációja az IC-ben és az EC-ben azonos:

$$ADC(\Delta \rightarrow 0) = fD_I + (1 - f)D_E, \quad (2)$$

ahol  $D_I$  az IC tartományban lévő víz,  $D_E$  az EC-ben lévő vízmolekulák diffúziós koefficiense,  $f$  pedig az IC térfogatfrakciója, azaz  $f = V_I / (V_I + V_E)$ . Fontos megjegyezni, hogy ehhez az összefüggéshez a következő feltételezéseken keresztül lehet eljutni: a  $\Delta$  érték elhanyagolhatóan kicsi, a T2 relaxációt nem befolyásolja a mérést, legalábbis a T2 érték az IC és EC térben azonos; a víz koncentrációja a kompartmentekben azonos. Ezek a feltételezések távolról sem teljesülnek egy reális modellrendszerben. Ami a diffúziós időt illeti, a reális mérési paraméter:  $\Delta = 10\text{-}50$  ms. Ez az idő elegendő arra, hogy egy átlagos testi sejt víztartalmának akár 50%-a is kicserélődjön [4]. Pfeuffer tanulmányában F98 glioma sejteken, asztrocita sejteken, és epiteliális sejteken végzett modellkísérletei átlagosan 50 ms-os intracelluláris tartózkodási időt becsült a vízmolekulákra,  $10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s intracelluláris diffúziós tényező mellett. Könnyen látható, hogy nem teljesül az a feltétel, hogy az IC és EC tartományban lévő víz a mérés ideje alatt szeparáltnak tekinthető. Más szavakkal, nem teljesül az a feltétel, hogy az IC-ből és az EC-ből egymástól független jel származzon. A (2) képlet érvényességének másik feltétele, azaz az IC és EC terek T2 relaxációs azonossága szintén nem teljesül. Amíg T2 relaxációs idők az IC-ben 30-70 ms nagyságrendbe esnek, míg az EC-ben ~200 ms-os időkkel lehet számolni, természetesen a relaxációs idők a térerősségtől függenek [3, 5]. Ami a víz koncentrációját illeti, ez szövettípustól jelentősen függ, a különbségek azonban az EC és IC tér között semmiképpen sem hanyagolhatók el, ezzel a (2) képlet érvényességét veszíti az (1) egyenlet azonban továbbra is érvényes. Amíg azonban térfogatfrakciók és azok patológiai változása könnyen becsülhető, addig a populációk

számosságát rendkívül nehéz. Felmerül továbbá az, hogy a fenti gondolatmenet a víz szerkezeti tulajdonságát figyelmen kívül hagyja. Azaz a vizet egyszerű folyadékként kezeli. Számos tanulmány mutat rá a víz és a sejten belüli szilárd anyagok szerkezeti tulajdonságaira [2, 6-9]. A sejten belül uralkodó alacsony vízkoncentráció in-vitro oldatokban nehezen, vagy egyáltalán nem állítható elő csapadék megjelenése nélkül. A sejt belseje meglehetősen zsúfolt tér, az emlős sejtekben a protein koncentrációja 20-30 g/100 ml [10]. Miközben e koncentráció a szorosan illeszkedő kemény gömbökre tett koncentráció becsült értéke alatt marad [11], ezen a koncentráción számos protein kristályosodik [12]. A víz ozmotikus kivonása az intracelluláris térből csak egy határig folytatható. Ez a felismerés vezetett az ozmotikusan inaktív víz fogalmához [6], valamint az intracelluláris protein-víz interakciók újraértékeléséhez [13,14]. Az oldott anyagok a víz szerkezetét befolyásolják, dinamikus hidratációs rétegeket alakítanak ki saját maguk körül, ezek szerkezetükben különbözők, méretük a nm-es skálára esik [15, 16, 17]. A vízmolekulák tartózkodási ideje ezen kompartmentekben különböző. A tartózkodási idők ugyanakkor még csak nem is jellemezhetők egyetlen karakterisztikus idővel [18]. A protein-víz találkozási felület egyetlen hidratációs pontján sem létezik egy jól meghatározott tartózkodási idő. Ehelyett a tartózkodási idők széles eloszlása jellemző, amelyekben extrém hosszú és rövid komponensek is vannak ( $t_1$ ,  $t_2$ ). Ezek a karakterisztikus idők jellemzően:  $t_1 = 0,5-5$  ps, illetve  $t_2 = 20-200$  ps lehetnek. Ezek az idők jóval rövidebbek, mint a  $\times 10$  ms-os MR diffúziós kísérletek ideje. Habár ezek a tartózkodási idők rövidek, így az MR mérések számára nem detektálhatók, közvetlenül meghatározzák a hidratációs rétegek populációinak diffúziós viselkedését. Molekuláris dinamika tanulmányok [19] rámutatnak, hogy a víz diffúziója az oldott molekula közelében kb. 50%-kal is csökken, az a tartomány, amelyben csökkent diffúzió tapasztalható a felülettől akár 5-10  $\mu\text{m}$  távolságig húzódhat, ez pedig a sejtek méretével összevethető. A felülettel párhuzamos irányú diffúzió gyorsabb, mint az arra merőleges irányú, valamint, hogy a diffúziós tényező távolságfüggésének profilját az oldott molekula minősége befolyásolja. Ez összhangban van azzal az MR kísérleti tapasztalattal, hogy a hosszú oldott molekulák, illetve a több adszorpciós hellyel rendelkező molekulák jobban csökkentik a víz diffúzióját, mint a globuláris, illetve a kevesebb hidratációs hellyel rendelkező molekulák [20].

Az intracelluláris térben, döntő többségben a víz hidratációs rétegekben található. Ezek sokfélesége, valamint az a tény, hogy az ezekben diffundáló víz diffúziós tényezője nem jellemezhető egy karakterisztikus értékkel, megkérdőjelezi azokat a feltételezéseket, amelyek az (1) egyenlethez vezetnek.

### Nagyon hosszú diffúziós idő – lassú diffúzió: $\Delta \rightarrow \infty$

Hosszú ( $\Delta \rightarrow \infty$ ) határértékben az ergodikusság teljesül, a Brown-mozgást végző vízmolekulák a rendelkezésre álló teljes térfogatot teljesen bejárják, az átlagos elmozdulásnégyzet számításánál a sokaságra vett átlag az időátlaggal azonos. Egy kiszemelt molekula a mérés során minden tartományt bejár, bolyongása során trajektóriájának minden egymástól különböző tartományba eső szakaszainak összegzett hossza reprezentatív arányban van jelen a teljes bejárt úton. Mindez teljesül függetlenül attól, hogy a kiszemelt molekula kezdeti pozícióját hol választjuk meg, ha ettől függene, akkor a sokaságra vett átlag (amelyben minden lehetséges kezdőpont előfordul) nem egyezhet meg az időátlaggal. Milyen nagyra kell  $\Delta$  értékét választani, hogy ez teljesüljön? Ehhez meg kell vizsgálni az átlagos mozgékonytságot, a  $\Delta$  idő alatt megtett átlagos elmozdulást, valamint a rendszerre jellemző karakterisztikus méreteket. Legyen  $\lambda_{\max}$  a rendszerben legnagyobb karakterisztikus méret.  $\lambda_{\max}$  az a méret, amelyen még nem figyelhető meg ismétlődés<sup>2</sup>. Az ergodikusság teljesüléséhez a következő feltételnek kell teljesülnie:

$$\langle X^2(\Delta) \rangle_{\text{sokaság}} \gg \lambda_{\max}^2 . \quad (3)$$

Ezen a térbeli skálán alkalmazható a homogén térben történő Brown-mozgást leíró képlet, ahol  $D_e$  a hosszú idejű diffúziós tényező:

$$\langle X^2(\Delta) \rangle_{\text{sokaság}} = D_e \cdot \Delta . \quad (4)$$

Így az ergodikusság feltételét mérhető fizikai paraméterekkel megfogalmazva:

$$\Delta \gg \frac{\lambda_{\max}^2}{D_e} . \quad (5)$$

A fenti gondolatmenetből következik a következő modellalkotás. Egy  $\lambda_{\max}$  méretű alrendszer térbeli ismétlésével előállítható a teljes rendszer<sup>3</sup>. A diffúzió az elektromos vezetőképességgel együtt lineáris transzportjelenség. Pontos analógia van a két problémakör között. Kézenfekvő az ohmikus ellenállások háromdimenziós hálózatának analógiájából kiindulni a modellrendszer hosszú idejű diffúziójának meghatározásához [3].

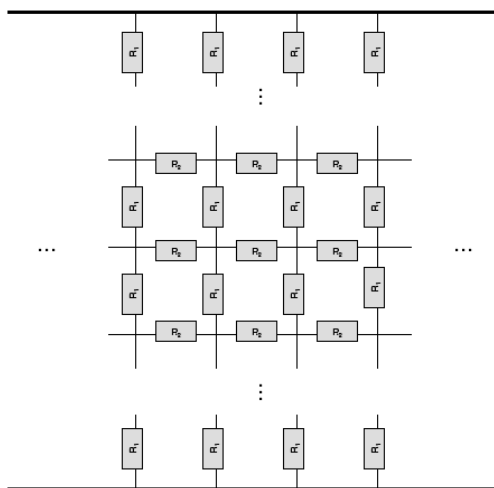
---

<sup>2</sup> Amennyiben a rendszer diffúziós térképének (minden térbeli ponthoz azt a diffúziós értéket rendeljük, amely az adott pontra jellemző, homogén és végtelen kiterjedésű közegben mérhető diffúziós tényező lenne) 3D térbeli Fourier transzformációját elvégeznénk, akkor  $1/\lambda_{\max}$  lenne annak a gömbnek a sugara, amin belül még nem elhanyagolható a transzformált függvény értéke.

<sup>3</sup> Természetesen ezzel az előállítással a  $\lambda_{\max}$  karakterisztikus méret megjelenik a modellrendszerben, azonban tudható, hogy semmilyen jelenség nem zajlik ezen a skálán a valódi rendszerben.

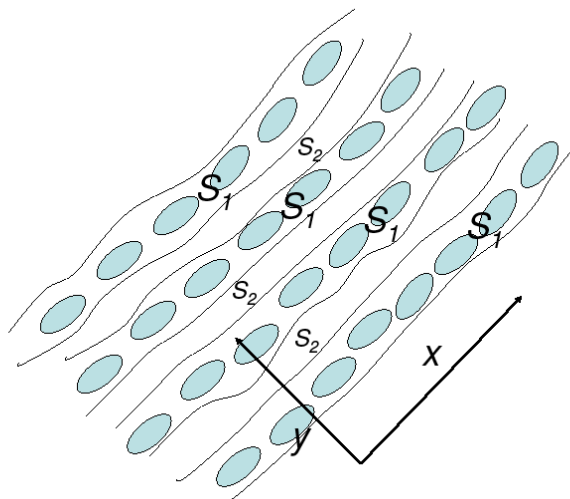


A probléma teljesen azonos a következő elektromosságban problémával. Mekkora a fajlagos vezetőképesség két végtelen sík között, amelyeket  $R_1$  és  $R_2$  ellenállások végtelen hálózata köt össze az 1. ábra szerinti elrendezésben?



1. ábra

E kétdimenziós probléma háromdimenziós általánosítása a diffúziós tényező–vezetőképesség, elektromos áramsűrűség–anyagáramsűrűség, elektromos feszültség–koncentrációgradiens fizikai mennyiségek megfeleltetésével az anizotróp diffúziós problémának felel meg.



2. ábra

A diffúziós probléma megfogalmazása a következő. A rendszer két alrendszerből áll:  $S_1$  és  $S_2$ .  $S_1$  azok a sejteket tartalmazó csövek, amelyekben a sejteket a sejtmembrán és extracelluláris

tér választ el. Ezek az elképzelt csövek a diffúziós mérés irányában állnak, azaz a gradiens irányával párhuzamosak, legyen ez az irány  $x$ . Az erre merőleges irányban a csöveket extracelluláris térből álló közeg veszi körül  $S_2$  (ld. 2. ábra sematikus rajz).

Az  $S_1$  és  $S_2$  állományok párhuzamosan kapcsolt vezetőkként viselkednek, amelyekre a  $P_1$ ,  $P_2$  permeabilitás és  $A_1$  illetve  $A_2$  keresztmetszet a jellemző. E paraméterek mellett a közeg permeabilitása (vezetőképessége) a következő módon határozható meg:

$$P_{\text{párhuzamos}} = \frac{A_1}{A_1 + A_2} P_1 + \frac{A_2}{A_1 + A_2} P_2 . \quad (6)$$

$y$  irányú mérés esetén természetesen sorosan kapcsolt közegekre kell a permeabilitást származtatni.

$$\frac{1}{P_{\text{soros}}} = \frac{1}{P_1} + \frac{1}{P_2} . \quad (7)$$

Természetesen nem a különböző irányú diffúziós mérésekről, hanem a tényleges közeg önkényes párhuzamos, illetve soros felbontásáról van szó. Az eredményeknek a teljes rendszer felbontásának módjától jó közelítéssel azonosaknak kellene lenni.

Az így származtatott ADC értékek a következők.

Párhuzamos-soros felbontásban:

$$ADC_x^{\text{PS}}(\Delta \rightarrow \infty) = \frac{l_y l_z}{a_y a_z} \frac{a_x}{\frac{l_x}{D_C} + \frac{a_x - l_x}{D_E}} + \frac{a_y a_z - l_y l_z}{a_y a_z} D_E . \quad (8)$$

Illetve a soros-párhuzamos felbontásban:

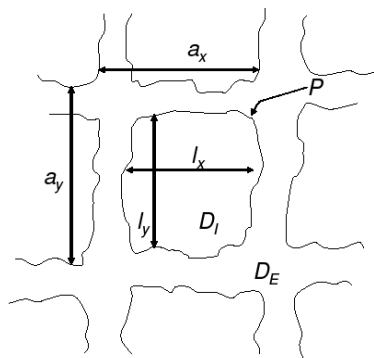
$$ADC_x^{\text{PS}}(\Delta \rightarrow \infty) = a_x \left[ \frac{l_x a_y a_z}{l_y l_z D_C + (a_y a_z - l_y l_z) D_E} + \frac{a_x - l_x}{D_E} \right]^{-1} , \quad (9)$$

ahol  $a_x$ ,  $a_y$ ,  $a_z$  az extracelluláris teret,  $l_x$ ,  $l_y$ ,  $l_z$  pedig az intracelluláris teret jellemző távolságok az adott  $S_1$ ,  $S_2$  felbontásban.  $D_E$  az extracelluláris tartomány diffúziós tényezője,  $D_C$  pedig az intracelluláris tér diffúziós tényezőjéből ( $D_I$ ) és a sejtmembrán véges permeabilitásából ( $P$ ) származtatott diffúziós tényező (ld. 3. ábra).

$$\frac{1}{D_C} = \frac{2}{P \cdot l_x} + \frac{1}{D_I} . \quad (10)$$

$D_C$  fenti (10) meghatározása egydimenziós bolyongásból származtatott összefüggés [21]. Az egydimenziós közelítés önmagában elégtelen leírás. A  $P \rightarrow 0$  esetben  $D_C \rightarrow 0$ , ami a párhuzamos lehetséges trajektóriák miatt nyilvánvalóan nem teljesül. Az  $S_1$  és  $S_2$  tartományok

párhuzamos csatolása ezt a problémát kiküszöböli. A geometriai és az EC illetve IC tartományok fizikai paramétereit szemlélteti a 3. ábra:



3. ábra – Szafer et al. MRM 1995 cikke alapján reprodukálva

Ez az eljárás matematikailag rendkívül egyszerű és követhető utasításokat ad pl. egy szövettani metszet elemzése során az  $S_1$  és  $S_2$  tartományok geometriai meghatározásához. A modell az összes fontos geometriai paramétert tartalmazza, valamint az EC és IC tartományok diffúziós paramétereit és a sejtmembrán permeabilitását, ezért alkalmas e paraméterek hatásának független modellezésére. Ugyanakkor az  $S_1$  és  $S_2$  állományokra való felosztás önkényes, így a származtatott geometriai paraméterek reprodukálhatósága kérdéses. A modell hiányossága, hogy a sejtet állományt valószerűtlen négyzetrácsos elrendezésben tételezi fel, a párhuzamos és soros felbontás eredményei csak közelítik egymást<sup>4</sup>.

A Monte-Carlo-szimulációkkal való összehasonlításban ez a modell jó közelítéssel adja vissza a szimulációk eredményeit. Ez a modell hasznos segítséget ad az anizotróp diffúzió értelmezéséhez anizotróp szövetek esetén, a Diffúzió Tenzor Képkalkotás (DTI – Diffusion Tensor Imaging) értelmezéséhez, amely az EMT (Effective Medium Theory - Effektív Médium Elmélet) modellben körülményesebb feladatnak bizonyul [22]. A modell alapfeltételezése az, hogy a diffúziós idő hosszú, ami alatt a bolyongást végző vízmolekulák a rendelkezésre álló teret bejárják. A relaxációs jelenségek ezen az időskálán már nem hanyagolhatók el, a modell azonban a T2 relaxációs folyamatokat is elhanyagolja. A sejtmembrán relaxációs folyamatban játszott, kiemelt szerepéről nem ad számot.

<sup>4</sup> A modell MRI irodalmi megjelenésének idejében sokkal körültekintőbb elméleti modellek álltak rendelkezésre. Ennek ellenére a publikációt nagy számban idézik.

### *Véges diffúziós idő*

A véges diffúziós idő mellett lezajló mérésekről a két fentiekben vázolt szélsőséges esetből ( $\Delta \rightarrow \infty$  illetve  $\Delta \rightarrow 0$ ) nehéz következtetéseket levonni. A véges idejű mérések esetén éppen a lokális anomáliák válnak fontossá. Ilyen a sejtmembrán közelében, a sejtek közötti térben lezajló diffúzió, miközben e sajátos diffúziós viselkedést mutató tartományok közötti kicserélődés nem elhanyagolható. Az idő és a távolság egyaránt jellemzi a vizsgálati tartományt homogén közegben. Heterogén közegekben azonban a karakterisztikus tartományokhoz (pl. vezikulum méretek, sejtméret stb.) különböző mobililitás és ettől akár független tartózkodási idő társul. Elvileg tehát a különböző tartományok egymással kölcsönható rendszerének statisztikai elemzése vezethet elméleti megfontolásokhoz. Szafer és munkatársai 1995-ös MRM [3] közleményben ezt a tartományt csak szimulált szövetmodellen Monte-Carlo szimuláció segítségével vizsgálta.

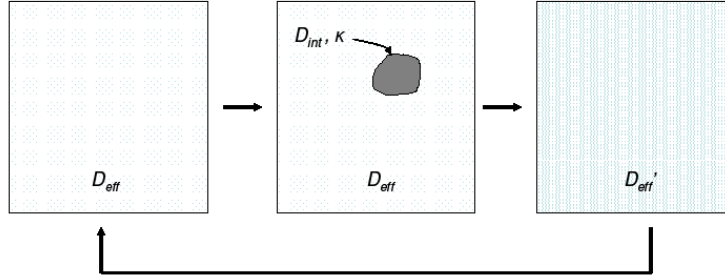
### **Heterogén közegek diffúziójának EMT modellje**

Az Effektív Médium Közelítés (továbbiakban EMT) – a fizika számos területén szokásos eljárás, amikor összetett rendszer nagy léptékű tulajdonságait kell leírni. Az eljárás a heterogén rendszerek diffúziója (IC és EC tartományokból felépülő rendszer), elektromos vezetőképessége (különböző vezetőképességű szemcsék sajtolásával előállított vezető), mechanikai tulajdonságai (porózus közetek, betonkeverékek) meghatározásában egyaránt alkalmazást nyer. Egy makroszkopikus rendszerekben, ha egy kisméretű alrendszer tulajdonsága megváltozik, akkor a geometriától és a leíró egyenletektől függően egyértelmű módon kezelhető az egész rendszer tulajdonságának változása. Amennyiben újabb alrendszer változik, akkor az már egy, az első lépésben megváltozott tulajdonságú rendszert befolyásol. Az eljárás egyre bonyolultabbá válik, különösen, amennyiben az alrendszerek egymással kölcsönhatnak. Bizonyos feltételek mellett azonban megtehető, hogy egy alrendszer változásának hatása a teljes rendszer egészében úgy jelenjen meg, mintha egy, makroszkopikus tulajdonságában ugyan különböző, de homogén rendszer állna elő. Ezzel az újabb alrendszerek változásának hatását vissza lehet vezetni az előző lépésekre, és így egy rekurzív módszer áll elő.

Ezt a modellalkotási eljárást követi Latour és munkatársainak tanulmánya a víz időfüggő diffúziójáról, vörösvértestek (VVT) és extracelluláris tér által alkotott biológiai modell rendszerben [22]. A modell a hosszú diffúziós idejű mérések esetére vonatkozik ( $\Delta \rightarrow 0$ ). Az

diffúziós tényező általános definíciója:  $D(t) = \langle r^2(t) \rangle / (6t)$ . Hosszú idők esetén ez az időfüggő diffúziós tényező egy határértékhez tart, amely az effektív diffúziós idő:  $\lim_{t \rightarrow \infty} D(t) = D_{\text{eff}}$ . Latour EMT modellalkotási eljárása a következő. A VVT-ket a sugarú,  $\kappa$  permeabilitással jellemzett membránnal határolt gömbnek vehetők. Az intracelluláris térre és az extracelluláris térre vonatkozóan az a feltételezés, hogy a diffúzió szempontjából homogének,  $D_{\text{int}}$  és  $D_{\text{ext}}$  tényezőkkel jellemezhetők. További paraméterek a víz (térfogat/térfogat) koncentrációi az IC és EC térben:  $c_{\text{int}}$  és  $c_{\text{ext}}$ , az extracelluláris tér térfogatfrakciója:  $\phi$ , és a sejtméret:  $a$ . Az első lépésben egyetlen VVT-t helyezünk az extracelluláris teret alkotó közegbe (amely a tényezővel  $D_{\text{ext}}$  jellemezhető). Ez a diffúziós trajektóriákat módosítja, a hipotetikus diffúziós áram megváltozik. Ez a változás egzakt, analitikus módon számolható. A probléma analóg az elektromos vezetőképesség problémájával. Az így előállt közeg a továbbiakban egy homogén  $D_{\text{ext}}'$  tényezőjű közegként közelíthető. Ez a közelítés csak a VVT-től nagy távolságokban helyes, a VVT-hez közel nem érvényes. A következő VVT behelyezése ugyanígy kezelhető, azzal a különbséggel, hogy a kiindulási diffúziós tényező  $D_{\text{ext}}$  helyett az effektív  $D_{\text{ext}}'$  tényezőtől kell kiindulni. A továbbiakban ez a rekurzív eljárás követendő (ld. 4. ábra). Nyilvánvaló, hogy a közelítés érvényessége híg VVT szuszpenzióra korlátozódik. Ez azt jelenti, hogy a VVT-k egymás hatását nem befolyásolják, ez akkor teljesül, ha egymástól nagy távolságban helyezkednek el. A modell feltételezése tehát az, hogy 1. a diffúziós idő hosszú  $t \gg \frac{\lambda_{\text{max}}^2}{D_{\text{eff}}}$  (vö. (5)), másrészt a VVTk átlagos távolsága nagy. Ez utóbbi számszerű

alsó határának becslése a  $\kappa$ ,  $D_{\text{int}}$ ,  $D_{\text{ext}}$  és  $a$  fizikai paraméterek ismeretében lehetséges. Nyilvánvaló, hogy ezek az elhanyagolások milyen fizikai jelenségek elhanyagolásához vezetnek. Amennyiben a sejtek átlagos távolságát megtartva a sejtek elrendezése megváltozik, ez a modell ezt nem képes leírni. Tehát a sejtek elrendezési geometriájára a modell érzéketlen, ugyanakkor a sejtméret, valamint a sejtek közötti átlagos tartomány a közelítés végeredményében szerepelnek. Amennyiben az MR mérés térbeli felbontóképessége  $V$  térfogatot jelöl ki, amely jóval nagyobb, mint a sejtek közötti távolság által kijelölt térfogat, akkor elmondható, hogy ezen a térfogaton belüli változások esetén a mérés érzéketlen, ugyanakkor bizonyos, ennél kisebb tértartományokról hordoz információt, de csak azok  $V$  térfogatra vett átlagértékéről. Az MR mérések azonban amúgy is átlagértékeket szolgáltatnak, ez a megszorítás nem jelent problémát a mérések értelmezésében.



4. ábra – az EMT rekurziós eljárás sematikus rajza

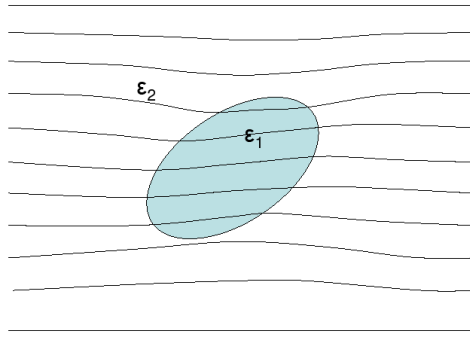
Fontos megjegyezni, hogy ez a modell lineáris abban az értelemben, hogy a sejtek hatása egymástól függetlenül szuperponálódik, azaz  $N$  db sejt hatása egyetlen sejt hatásának  $N$ -szerese. Ebben a közelítésben a rekurzív formula a következő eredményre vezet:

$$\frac{D_{\text{eff}} c_{\text{eff}} - D_2 c_2}{D_{\text{eff}} c_{\text{eff}} + 2D_2 c_2} = f \frac{D_{\text{in}} c_1 - D_2 c_2}{D_{\text{in}} c_1 + 2D_2 c_2}, \quad (11)$$

ahol  $f$  az intracelluláris tér térfogatfrakciója,  $c_{\text{eff}} = c_1 f - c_2 (1 - f)$ , az extracelluláris tartomány diffúziós tényezője  $D_1$ , itt a víz koncentrációja  $c_1$ , míg az intracelluláris tartomány diffúziós tényezője  $D_2$ , itt a víz koncentrációja  $c_2$ .  $D_{\text{in}}$  egy, az egydimenziós modellből származtatott diffúziós tényező, amely a sejtek diffúziós tényezőjét és a sejtmembrán permeabilitását is figyelembe veszi:  $(D_{\text{in}} c_1)^{-1} = (\kappa a)^{-1} + (D_1 c_1)^{-1}$  (vö. (10) és [21]. Ez a közelítés híg sejtuszuspenzióra érvényes.

Ez a durva közelítés tovább finomítható a differenciális EMT megközelítéssel. Ebben a továbbfejlesztett módszerben a sejtek alakja is meghatározóvá válik. Ehhez meg kell határozni az egyetlen VVT behelyezésének pontos hatását.

Ez a probléma megegyezik azzal az elektrosztatika problémával, amikor egy eredetileg homogén térbe helyezett a közegtől ( $\epsilon_2$  permittivitás) eltérő permittivitású ( $\epsilon_1$ ) gömb, ellipszoid esetén kell meghatározni az így kialakuló elektromos teret [23].



5. ábra – Simonyi Elméleti Villamosségtan 2.39 példa ábrájának reprodukciója

A probléma megoldása gömb esetén gömbkoordinátákban megoldott Laplace egyenlet viszonylag egyszerű feladat, ellipszoidra konfokális koordináta-rendszerben szintén egyszerűen kezelhetővé válik. A különböző gyakorlati alkalmazásokban az irodalom a gömb esetét tárgyalja [22, 24].

Anizotrop esetben (pl.: DTI tanulmányozásához) az ellipszoid, illetve henger esetét célszerűbb tárgyalni, itt azonban elég az izotrop esettel foglalkozni. A gömbtől való eltérés részleteitől a fent említett átlagolás miatt el lehet tekinteni.

Az elektrosztatikus, illetve vezetőképességgel kapcsolatos probléma esetén a vezetőképesség ( $\sigma$ ) matematikailag azonos szerepet tölt be, mint a diffúziós problémánál a diffúziós tényező és a vízkoncentráció szorzata, a megfeleltetés egyértelmű ( $\sigma \leftrightarrow D \cdot c$ ). Az effektív diffúzió változásának meghatározásához meg kell adni, hogy az intracelluláris tartomány infinitezimális változása milyen infinitezimális változást idéz elő  $D \cdot c$  mennyiségben.

$$d(D_{\text{eff}} c_{\text{eff}}) = (D_{\text{eff}} c_{\text{eff}}) \cdot m(D_{\text{eff}} c_{\text{eff}}) \frac{d\varphi}{\varphi}, \quad (12)$$

ahol  $m(D_{\text{eff}} c_{\text{eff}})$  a gömb esetén három dimenzióban:

$$m(D_{\text{eff}} c_{\text{eff}}) = 3 \frac{D_{\text{eff}} c_{\text{eff}} - D_{\text{in}} c_1}{2D_{\text{eff}} c_{\text{eff}} + D_{\text{in}} c_1}. \quad (13)$$

(12) integrálható ( $D \cdot c$ )-re itt a  $\sigma$  jelölést alkalmazva (a vezetőképesség analógia alapján) :

$$\int_{\sigma_{\text{ext}}}^{\sigma_{\text{eff}}} \frac{1}{m(\sigma') \cdot \sigma'} d\sigma' = \int_{\varphi}^1 \frac{1}{\varphi'} d\varphi' = \ln(\varphi). \quad (14)$$

A (14) egyenlet bal oldalán lévő integrált elvégezve az eredmény:

$$\frac{D_{\text{eff}} c_{\text{eff}} - D_1 c_{\text{int}}}{D_{\text{ext}} c_{\text{ext}} - D_1 c_{\text{int}}} \cdot \left( \frac{D_{\text{ext}} c_{\text{ext}}}{D_{\text{eff}} c_{\text{eff}}} \right)^{1/3} = \varphi, \quad (15)$$

$$\text{ahol: } D_{\text{eff}} c_{\text{int}} = \frac{D_{\text{eff}} c_{\text{eff}} - \kappa a D_{\text{int}} c_{\text{int}}}{\kappa a + D_{\text{int}} c_{\text{int}}}, \quad \text{és } c_{\text{eff}} = \varphi \cdot c_{\text{ext}} + (1 - \varphi) \cdot c_{\text{int}}.$$

A differenciális és egyszerű EMT modell között az alapvető különbség, hogy az egyszerű EMT modell, a sejtekkel való populáció lépéseiben végig ugyanakkora effektív diffúziós tényező változással számol, míg a differenciális EMT a populáció során az elemi lépések hatásának mértéke között különbséget tesz. Ez az  $m$  paraméter változásában nyilvánul meg. Felmerülhet, hogy a híg és a koncentrált sejtszuspenziók közötti különbség a bolyongást végző vízmolekula „emlékezete” különbözteti meg. Az összes itt tárgyalt elméleti modell Markov-folyamatot tételez fel. Nem arról van tehát szó, hogy egy molekula a trajektóriáját bejárva pl.: egy sejttel való találkozásról bármiféle információt hordozna magával. A híg és koncentrált szuszpenziók nem ilyen nem-markovi folyamat miatt különböznek, hanem a lehetséges trajektóriákon belüli IC és EC szakaszok arányában. A nem-markovi folyamatok ugyanakkor jelentős szerepet játszanak alacsony viszkozitású közegben. Az emlékezetet általában a közegben keltett örvényeknek szokás tulajdonítani [25], ezek a folyamatok vezetnek az autokorrelációs függvények hosszú idejű lecsengéséhez (long-time tails). A biológiai szövetek, különösen az intracelluláris tartomány azonban magas fehérjekoncentrációja miatt mikroszkopikus léptéken is nagy viszkozitású, ezért a vízmolekulák pozíciójának autokorrelációjában ettől a hosszú távú lecsengéstől el lehet tekinteni.

Érdemes az EMT modell eredményeiről és korlátairól említést tenni. A modell híg és koncentrált sejtszuspenziókra is érvényes összefüggést ad annak fizikai tulajdonságai között. A  $\varphi = 0$  határértékben (15) összefüggés a sejtek szorosan illeszkedő, EC tér nélküli állományra az elvárt (16) összefüggést eredményezi:

$$D_{\text{eff}} = \frac{D_{\text{int}}}{1 + c_{\text{int}} \frac{D_{\text{int}}}{\kappa a}}. \quad (16)$$

A  $\kappa = 0$  határértékben a (15) összefüggés a  $D_{\text{eff}} c_{\text{eff}} = D_{\text{ext}} c_{\text{ext}} \cdot \varphi^{2/3}$  összefüggést eredményezi, a porózus közegek vizsgálatának kísérleti eredményivel összhangban. Ez utóbbi összefüggést Archie törvényként szokás idézni [26].

A (15) egyenletben szereplő  $1/3$  kitevő a háromdimenziós gömbszimmetrikus problémára utal, ugyanez a kitevő kétdimenziós esetben  $1/2$ . Az eljárás általánosításával gömbszimmetrikus eset helyett összefüggés határozható meg a nyújtott alakú sejtekre gömb helyett ellipszoidra számolva ki a (13) összefüggést. Ez a továbbfejlesztés ugyanolyan feltételek mellett igaz, továbbá az anizotrop eset tárgyalását is lehetővé teszi. A Szafer és



munkatársai által közölt modellhez képest nyilvánvalóan elegánsabb, de főként jóval eredményesebb ez a megközelítés<sup>5</sup>, nem tartalmaz önkényes kompartment kijelölést. Az EMT modell dacára annak, hogy a mérés térbeli skálája meghaladja a sejtméreteket, mégis elégséges információt hordoz az ezen a léptéken megjelenő fizikai paraméterekről (sejtmembrán permeabilitása, koncentrációviszonyok, sejtméret, sőt sejtek alakja). Az EMT modell csak hosszú diffúziós idejű mérések értelmezésére alkalmas, alapfeltétel, hogy a Brown-mozgást végző vízmolekulák a rendelkezésre álló teljes tartományt bejárják a mérés ideje alatt.

Jelen tanulmány kereteit meghaladja ugyan, de mégis érdemes néhány szót ejteni az EMT modell alkalmazási lehetőségéről az anizotrop diffúzió vizsgálatában. A DTI számos diagnosztikai területen nyert alkalmazást, számos kérdés azonban még mindig tisztázatlan. Pl.: Mi az oka annak, hogy rendre nagyobb a diffúziós tenzor második sajátértéke, mint a harmadik sajátértéke? Mi a legmegfelelőbb, a diffúziós irányok számát illetően, és milyen iránybeli eloszlást szükséges követni (a gömbszimmetrikusnál bizonyosan van hatékonyabb eloszlás)? Szükség van-e az izotrop voxelekre a DTI alkalmazása során?

Az 5. ábra jól illusztrálja, hogy a sejteken belül a térerősség (diffúzió iránya) nem párhuzamos sem az ellipszoid hossz tengelyével, sem pedig a külső nem perturbált tér (diffúziós áram) irányával. Könnyen belátható, hogy ennek következtében a diffúziós tenzorhoz rendelt zárt másodrendű felület (ellipszoid) gömbtől való különbözősége és a sejtek gömbtől való különbözősége között jó megfeleltetés teremthető, de ez az anizotrópia (pl.: frakcionális anizotrópiában kifejezve) számszerűen nem azonos. Ráadásul ezt az IC és EC tér diffúziós tényezői, valamint a sejtmembránok permeabilitása is befolyásolja. Mindezen problémákat a mérés tökéletlensége (jel-zaj viszony limitált), és a DTI során kiválasztott irányok számának limitáltsága (mérés ideje) csak súlyosbítja. A frakcionális anizotrópia élettani folyamatokkal való megfeleltetéséhez e tényezők hatásának vizsgálata szükséges, amihez az EMT elégséges eszközökkel szolgál. Ugyanakkor a DTI irányainak kijelöléséhez is segítséget nyújtana egy ilyen analízis. A diffúziós tenzor két kisebb sajátértékének különbözősége visszavezethető az elméleti modellben a sejteket reprezentáló ellipszoidok tengelyei közötti különbségre. Ugyanakkor feltételezhető olyan eset is, amikor a kisebb tengelyek ugyan megegyeznek, de a hossz tengelyek irányának eloszlása a rostok irányára nézve nem hengersizmetrikus. Ennek vizsgálatához az ellipszoidokra megoldott (13) összefüggésre van szükség, valamint a hosszirányok különböző eloszlásának elemzésére.

---

<sup>5</sup> Meglepő, hogy Szafer [3] tanulmánya Latour [22] tanulmánya után került publikálásra.

## Porózus közeg – relaxáció hatása

A porózus közetek vizsgálata a közetfizikai kutatások fontos területe. A porózus közegekben való diffúziós tulajdonságok fontos információval szolgálnak a közeg mikrostruktúráját illetően. Ezek a mikroszkopikus paraméterek meghatározzák a transzportfolyamatokat. A karakterisztikus méretek, pórus méretek, pórusokat összekötő torkok, pórusok eloszlása, geometriai tényezői (tortousity) a korlátozott Brown-mozgást meghatározzák. A lágy szövetek diffúziós tulajdonságait illetően sok tekintetben hasonlítanak a porózus közetekhez, a legnagyobb különbség a különböző tartományok közötti átjárhatóságban van. A porózus közegek vizsgálata eredményezett olyan megfontolásokat, amelyek a diffúzió és a relaxáció szoros kapcsolatát írják le. A hosszú diffúziós idők a rendszer tortousity paraméteréről hordoznak információt, de a pórusméretről nem. A T1 relaxációs idő a relaxáló falak és a pórusok méretéről is nyújt információt, elsősorban azonban a falak relaxivitása a meghatározó. A diffúziós mérések rövid diffúziós idő mellett a pórus méretéről, geometriájáról adnak információt a pórusfalak relaxációjától függetleníthető módon. A rövid diffúziós idejű mérések továbbá azért is hasznosak, mert az erős relaxáló ágensek jelenlétében a jelcsökkenés problémát jelent (jel-zaj viszony). A relaxáló falak közötti diffúzió leírása a relaxációs és diffúziós folyamatok összekapcsolását hozták, e megközelítés számos új módszer bevezetéséhez vezetett [27, 28]. Az előzőekben tárgyalt egyszerű diffúziós modellekben valamint az EMT közelítésben a relaxációt el kellett hanyagolni. Mint alább kiderül, ez nemcsak pontatlanságokhoz vezet, hanem fontos jelenségek figyelmen kívül hagyásához.

A PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin-Echo) kísérletek elméleti szempontból azért különösen érdekesek, mert közvetlenül a diffúziós propagátor Fourier spektrumát méri. Legyen a PFGSE jelamplitúdója  $M(\mathbf{k}, t)$ , ahol  $\mathbf{k}$  a hullámszámvektor,  $t$  a spin-echo kísérlet echo ideje. A diffúziós propagátor  $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}_1, t)$  az a valószínűsége, hogy egy  $\mathbf{r}$  pozícióból induló bolyongó részecske milyen idő múlva található  $\mathbf{r}_1$  pozícióban  $t$  idő elteltével. Egy adott térfogatban bolyongó részecskére a spin-echo kísérletben a jelhez való hozzájárulás:

$$M(\mathbf{k}, t) = \frac{1}{V} \int_V d\mathbf{r} d\mathbf{r}_1 e^{i\mathbf{k} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}_1)} G(\mathbf{r}, \mathbf{r}_1, t) . \quad (17)$$

Amennyiben a rendelkezésre álló tartományban a víz úgy viselkedik, mint egyszerű folyadék, akkor a diffúziós propagátor a következő egyenletnek tesz eleget:

$$\frac{\partial G(\mathbf{r}, \mathbf{r}_1, t)}{\partial t} = D_0 \nabla^2 G(\mathbf{r}, \mathbf{r}_1, t) - \mu G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) \Big|_{\mathbf{r} \in V} . \quad , t > 0 \quad (18)$$

A (18) kezdeti feltétele:  $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}_1, t = 0^+) = \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_1)$ . A (18) differenciálegyenlethez tartozó határfeltétel tartalmazza a pórusfal tulajdonságát,  $\gamma=0$  esetén teljesen reflexív, véges  $\gamma$  pedig relaxációs hatást tételez fel ( $\mathbf{n}$  a pórusfal normálvektora,  $S$  pedig a pórusfal felületét jelöli),  $\mu$  a térfogati relaxációs hatást írja le:

$$D_0 \mathbf{n} \nabla G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) + \gamma G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) \Big|_{\mathbf{r} \in S} = 0 . \quad (19)$$

A fenti diffúziós probléma megoldása az  $\mathbf{R}=\mathbf{r}-\mathbf{r}'$  jelöléssel a következő alakban írható fel:

$$G(\mathbf{R}, t) = \sum_{n=0}^{\infty} A_n F_n(\mathbf{R}) \cdot e^{-t/T_n} , \quad (20)$$

ahol  $A_n$  konstans,  $F_n(\mathbf{R})$  pedig a következő sajátérték probléma ortogonális sajátfüggvényei:

$$\frac{F_n(\mathbf{R})}{T_n} = -D_0 \nabla^2 F_n(\mathbf{R}) + \mu F_n(\mathbf{R}) , \quad (21)$$

a következő határfeltétellel:

$$(\mathbf{n} D_0 \nabla F_n(\mathbf{R}) + \gamma F_n(\mathbf{R})) \Big|_{\mathbf{R} \in S} = 0 . \quad (22)$$

$T_n$  sajátértékek a következő sorrendbe állíthatók:  $T_0 \geq T_1 \geq T_2 \geq T_3 \geq \dots \geq 0$ .

A sajátfüggvények relatív intenzitáskülönbségei,  $\sum_{n=0}^{\infty} I_n = 1$ :

$$I_n = \frac{1}{V} \frac{\left[ \int F_n(\mathbf{R}) d^3 \mathbf{R} \right]^2}{\int F_n^2(\mathbf{R}) d^3 \mathbf{R}} . \quad (23)$$

A megfigyelhető jelintenzitás a következő alakban írható fel:

$$Sig(t) = Sig(t=0) \sum_{n=0}^{\infty} I_n \cdot e^{-t/T_n} . \quad (24)$$

A zárt geometriának (határfeltétel) köszönhetően különböző exponenciális lecsengésű módusok jelennek meg a jelcsökkenésben. Az alábbi táblázat összefoglalja a határfeltételtől függő megoldásokat,  $M$  a felületi átlagos relaxációt jelöli,  $a$  a sejtméretet  $D_0$  a diffúziós tényezőt:

	Sík – „P”	Hengeres – „C”	Gömb – „S”
$I_n$	$4 \sin^2 \xi_n / \xi_n [2\xi_n + \sin(2\xi_n)]$	$4J_1^2(\eta_n) / \eta_n^2 [J_0^2(\eta_n) + J_1^2(\eta_n)]$	$\frac{12(\sin \varsigma_n - \varsigma_n \cos \varsigma_n)^2}{\varsigma_n^3 [2\varsigma_n - \sin(2\varsigma_n)]}$
$T_n$	$a^2 / D_0 \xi_n^2$	$a^2 / D_0 \eta_n^2$	$a^2 / D_0 \varsigma_n^2$
$F_n$	$\cos(\xi_n z / a)$	$J_0(\eta_n R / a)$	$\cos(\xi_n z / a)$
Sajátfüggvény tényezője implicit alakban	$\xi_n \operatorname{tg} \xi_n = Ma / D_0$	$\eta_n J_1(\eta_n) / J_0(\eta_n) = Ma / D_0$	$1 - \varsigma_n \cot \varsigma_n = Ma / D_0$

**1.táblázat – Brownstein és Tarr, Phys. Rev.Lett. 1979 nyomán**

A fenti táblázat jól illusztrálja, hogy a korlátozott diffúzió során a jelcsökkenésben módusok jelennek meg, ami a mono-exponenciális jelcsökkenéstől való eltérést okozzák. Ezek a módusok annak függvényében képviseltetik magukat a jelcsökkenésben, hogy a felülethez odaérnek-e bolyongásuk során mielőtt relaxálnának. A geometria és a méretek a jelcsökkenésben közvetlenül megjelennek. A fenti okfejtés az MR mérés idő és térskálára való érzékenységet illusztrálja, valamint a kettő összefüggését, a relaxáció és a diffúzió szoros kapcsolatát teremti meg.

Brownstein és Tarr [29] tanulmányukban a zárt térfogatokban lezajló diffúzió és relaxáció jelenségét vizsgálták a diffúziós egyenlet sajátértékeinek sorfejtésével a  $k \rightarrow 0$  határesetben. Mitra [28] és munkatársai hasonló megközelítésben a diffúziós propagátor Fourier transzformáltjának  $k^2$ -estől való eltérését vizsgálták és ezzel a pórusok méretére illetve alakjára vontak le következtetéseket. A  $k^4$ -nel arányos tagban a pórusokat összekötő nyakak és torkok geometriáját térképezték fel. Megjegyzendő, hogy e munkákban elsősorban a felületi relaxáció hatását vizsgálták, ami porózus közetekben a pórusok falán elhelyezkedő elsősorban paramágneses szennyeződések miatt indokolt, Brownstein és Tarr [29] munkájában mindkét (felületi és térfogati) relaxáció szerepét vizsgálták. Callaghan és munkatársai [30, 31] szintén gyengén csatolt pórusok tulajdonságát tanulmányozták. A hosszú és vékony nyakakkal összekötött pórusok problémája a fenti tárgyalásmódban leírható azzal a kiegészítéssel, hogy a hosszútávú diffúziós viselkedésre vonatkozóan kiegészítést kell tenni. A hosszú nyakak mentén lehetséges a szabad diffúzió, ezek a véges  $L$ -jú mérésekben további járulékokat adnak, míg a pórusokon belül a lecsengés gyorsan lezajlik. A pórusok és a nyakak geometriailag szétcsatolt, szeparáltan tárgyalható alrendszerek, az MR jelhez adott, egymástól különböző időintervallumba eső járulékokkal. Ez a megközelítés elsősorban erősen relaxáló

hatású pórusfalak, valamint ezek közötti gyenge csatolás (vékony és hosszú kapillárisok, illetve rétegek) esetén alkalmazhatók. Corey és Garroway \*(MRM 1990) [32] elszigetelt pórusokra vontak le következtetéseket. A pórusok méretének eloszlása az átlagos jelcsökkenésben megjelenő multi-exponenciális viselkedéshez vezet. A pórusok méreteinek eloszlása és az exponensek eloszlása közötti megfeleltetés lehetővé teszi a mikrostruktúra tulajdonságainak értelmezését.

A porózus közegekre vonatkozó munkák eredményei közül érdemes itt felsorolni néhányat.

A rövid diffúziós idejű méréseknél tapasztalt diffúziós időfüggés kísérleti tapasztalat szerint [33]:

$$\frac{D(t)}{D_0} = 1 - konst. \cdot \sqrt{t} \quad . \quad (25)$$

Valójában (18) és (19)-ből,  $\mu=0$  és  $\Delta \rightarrow 0$  határértékben következik [22, 27, 28]:

$$\lim_{\Delta \rightarrow 0} \left( \frac{\partial \ln M(k, \Delta)}{\partial \Delta} \right) = -D_0 k^2 - \frac{\rho S}{V} \quad . \quad (26)$$

Amiből a rövid idejű mérésekre  $d$  dimenzióban az általános közelítés ( $\sqrt{D_0 t}$ -ben első rendig):

$$\frac{D(t)}{D_0} = 1 - \frac{4}{3d\sqrt{\pi}} \cdot \frac{\sqrt{D_0 t} S}{V} + O(D_0 t) \quad . \quad (27)$$

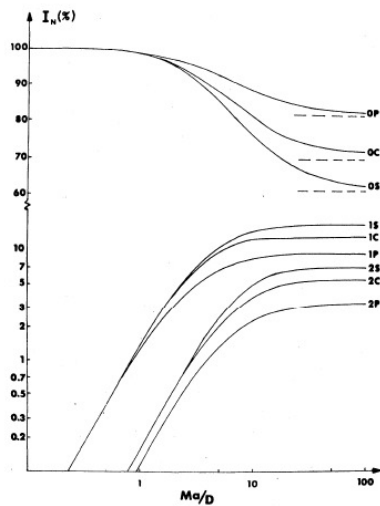
Brownstein és Tarr tanulmányának egyik fő gondolata, hogy az MR jel multiexponenciális csökkenésére alternatív magyarázatot adjon. Habár a tanulmány 1978-ban jelent meg, a mai napig él a kompartmentekkel való indoklás. Nevezetesen, a zérus permeabilitású közegben az intracelluláris és extracelluláris közeg egymástól független járulékanak tudható be a nem monoexponenciális viselkedés. Szafer et al. [3] a gyors mérésekre is kiterjeszti ezt az interpretációt, mondván a sejtmembránon való áthaladásra nem jut elég idő (TE echo idő alatt), az IC és EC tartományok szeparáltak maradnak.

$$\frac{1}{[T2(TE \rightarrow 0)]_{\text{eff}}} = \frac{\varphi}{T2_{\text{IC}}} + \frac{1-\varphi}{T2_{\text{EC}}} \quad . \quad (28)$$

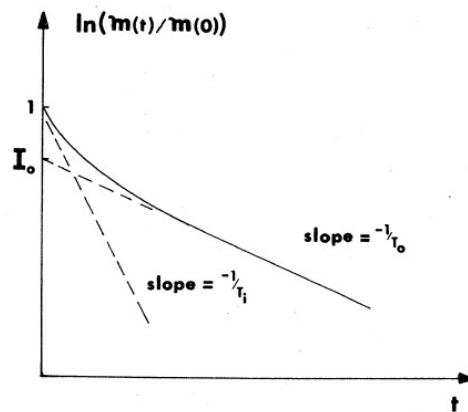
Ugyanez az argumentum vezet a (2) egyenletben leírt diffúzióra vonatkozó megállapításban. Amennyiben egymástól szeparált tartományok, fizikai tulajdonságukban egységesek és egymástól tartományonként különböznek, akkor ez a jelcsökkenésben biexponenciális lefutású lesz. Fordítva ez az állítás természetesen nem feltétlenül igaz, egyéb mechanizmusok állhatnak a háttérben.

Brownstein cikkében, Mitra tanulmányaiban a sajátértékek szerinti sorfejtés megmutatja, hogyan jelennek meg a saját módusok a jelcsökkenésben, ami egyszerűen a (18)

differentiálegyenlet (19) határfeltételek szerinti megoldásából következik. Ezek a módusok valóban az exponenciálistól való eltérést okoznak, semmiféleképpen nem rendelhetők azonban ezek fizikailag szeparált tértartományokhoz. A módusok dominanciája egymáshoz képest a diffúziós tényező ( $D$ : póruson belül homogénnek feltételezve) sejtméret ( $a$ ) és a térfogati relaxáció ( $M$ ) függvénye (reflexív pórusfal esetén). A relatív jelerősség az  $Ma/D$  paraméter függvényében látható a 6. ábrán.



6. ábra



7. ábra

6. ábra – A relaxációs módusok relatív erőssége a jelben, gömbszimmetrikus esetben (S), hengersizimmetrikus esetben (C), ill. planáris elrendezés esetében (P). A számok a sajátértékek sorszáma utalnak, a nagyobb szám kisebb sajátértékhez tartozik.

Brownstein, Tarr: Physical Review A, V19, N6, 1979 [29]

7. ábra – az MR jel intenzitásának időfüggése egyetlen zárt térfogat esetén, a kezdeti és végső (leglassabb lecsengés) meredekség közötti különbség a különböző módusok jelenlétére utal, nem pedig fizikailag szeparált kompartmentekre.

Brownstein, Tarr: Physical Review A, V19, N6, 1979 [29]

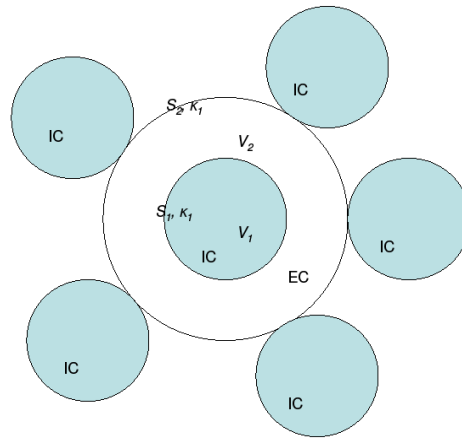
Éppen az Mitra tanulmányainak értéke, hogy a diffúziós propagátor  $k^2$ -es tagtól való eltérése (ami ekvivalens a monoexponenciális viselkedéssel) a mikrostruktúráról, mégpedig az összeköttetésben lévő pórusok geometriájáról ad felvilágosítást.

A diffúzió és relaxáció (18) és (19) egyenletek szerinti egységes kezelése teljes képet ad az MR mérésekben tapasztalt jelcsökkenésről. E modellekben azonban erős megkötés az, hogy a pórusfalak nem átjárhatók (a permeabilitás zérus). Ez a feltevés nehezen indokolható a biológiai szövetekben.

Brownstein és Tarr tanulmányukban a  $k \rightarrow 0$  esettel foglalkoztak. Ez a  $\Delta \rightarrow 0$  idejű esettel azonos a diffúziós kísérletekben. A 8. ábra egy sematikus rajz az elméleti modell érvényességének és továbbfejlesztési lehetőségének szemléltetésére. Biológiai szövetekben az a feltételezés, hogy  $S_1$  felület teljesen reflexív ( $\kappa_1=0$ ) nem tartható. Ez a feltétel abban nyilvánul meg, hogy a (19) egyenlet jobb oldala zérus, azaz a  $V_1$  térfogatból kiáramlás nincsen. Éppen ez a határfeltétel vezet a sajátfüggvények fent ismertetett alakjához. Ezen a feltételen módosítani egyszerű, a (19) egyenletben a ki és beáramlást is figyelembe vevő, permeabilitással arányos tagot szükséges bevezetni. Ugyanakkor az EC és IC terek között a vízáramlás egyensúlyban van, ez  $D_{intc_{int}}$  és  $D_{extc_{ext}}$  között összefüggést teremt. Ekkor azonban az EC-ben és az IC-ben különböző térfogati relaxációt is figyelembe kell venni. Tehát (19) egyenlet helyébe két ezzel azonos szerepet betöltő egyenlet lép az intracelluláris térre és az extracelluláris térre vonatkozó relaxációról és az  $S_1$  felületen történő ki és belépésről számot adó tagokkal. Felmerül azonban a kérdés, hogy mi történjék az  $S_2$  felületen (ld.: 8. ábra)? Amennyiben olyan rövid diffúziós időkkel kell csak számolni, ahol azon a trajektóriák járuléka, amelyek  $V_1$  térfogatból indulva  $S_2$  felületet elhagyják, elhanyagolhatók, akkor az  $S_2$  felület relaxivitása  $\rho|_{S_2} = \infty$  feltétel alkalmazható. Ez a közelítés alkalmazható, amennyiben

$$\Delta < \frac{\lambda_{EC}^2}{D_{eff}}, \text{ ahol } \lambda_{EC}^2 \text{ a } V_2 \text{ térfogathoz rendelt sugár, } D_{eff} \text{ pedig a } V_1 \text{ és } V_2 \text{ térfogathoz rendelhető}$$

effektív diffúziós tényező.



8. ábra

A (18) és (19) egyenletek helyébe lépő egyenletek tehát a következő módon alakulnak:

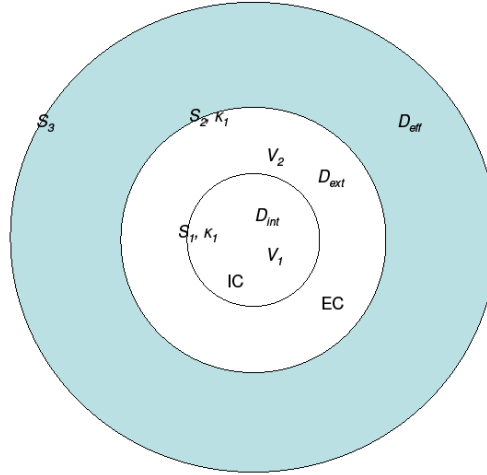
$$\frac{\partial G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t)}{\partial t} = D_{\text{int}} \nabla^2 G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) - \mu_{\text{int}} G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t), \quad t > 0, \mathbf{r} \in V_1 \quad (18-1)$$

$$\frac{\partial G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t)}{\partial t} = D_{\text{ext}} \nabla^2 G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) - \mu_{\text{ext}} G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t), \quad t > 0, \mathbf{r} \in V_2 \quad (18-2)$$

$$D_{\text{int}} \mathbf{n} \nabla G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) + \rho G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) + \kappa G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) = 0, \quad \mathbf{r} \in S_1, \text{ int} \quad (19-2)$$

$$-D_{\text{ext}} \mathbf{n} \nabla G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) + \rho G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) + \kappa G(\mathbf{r}, \mathbf{r}', t) = 0, \quad \mathbf{r} \in S_1, \text{ ext} \quad (19-2)$$

Továbbá, a sejten belüli víztartalom változatlansága miatt:  $D_{\text{int}} c_{\text{int}} = D_{\text{ext}} c_{\text{ext}}$ . A fenti egyenletekben a sejtmembrán külső és belső felületi relaxivitása, valamint a kintről-befelé, illetve a bentől-kifelé való áramlásra vonatkozó permeabilitás azonos.



9. ábra

Hosszabb diffúziós időkre felmerül az EMT-ben alkalmazott módszer és a zárt térfogatokra alkalmazott egzakt analitikus elemzés kombinációja (ld.: 9. ábra).

Az  $S_2$ -felületen kívül az EC és IC, valamint a sejtmembránok hatása figyelembe vehető, amennyiben egy effektív médiumot tételezünk fel, amely diffúziója az EMT modellből származtatható.  $S_3$  felülethez végtelen relaxitás rendelhető. Ebben a lépésben ugyan  $D_{\text{eff}}$  értéke csak közelítőleg igaz, de a probléma analitikusan megoldható, az extracelluláris tér hatása és a véges sejtmembrán permeabilitás is figyelembe vehető. Ezzel az eljárással a zárt pórusokból származtatott rövid idejű diffúziós mérések, valamint az EMT-ből származó hosszú idejű diffúziós mérések is kezelhetők, a véges diffúziós időkre pedig megalapozott közelítés származtatható. Ugyanakkor, e megközelítés nem adhat számot a sejtek közötti távolság léptékén megjelenő diffrakció-szerű jelintenzitás-platókról (ld. „Karakterisztikus hossz,  $q$ -space” bekezdés).



## Transzverzális relaxáció – helyfüggő Larmor frekvencia

A diffúzió és a relaxációs folyamatok kapcsolatát a porózus közegek modellje jól illusztrálja. Ez a klasszikus diffúziós modell a relaxáció mikroszkopikus és statisztikai vonatkozásaival nem foglalkozik. Ebben a modellben a relaxáció térfogati és felületi elnyelő közeg hatásaként értelmezhető. Ettől merőben eltérő megközelítést tárgyal Novikov és Kiselev [34]. Ebben a leírásban az NMR jel tulajdonságát írják le, amely egy heterogén Larmor frekvenciájú közegből származik. A tanulmány a T2 relaxáció mezoszkopikus skálájú folyamatával foglalkozik, ami a precessziós fázisok diszperziójának eredménye. Ebben a megközelítésben a Larmor frekvencia varianciája és a Larmor frekvencia, mint a térbeli koordináták függvénye, korrelációs függvénye összefüggésbe hozható az NMR jel spektrumával. A diffúzió és a relaxáció kapcsolatát e megközelítés úgy teremti meg, hogy a bolyongás trajektóriájának minden pontjához egy adott Larmor frekvencia tartozik. A bolyongás során az adott spin tehát fáziskülönbséget akumulál, amely egyrészt a diffúziós trajektóriától, másrészt a Larmor frekvencia térbeli eloszlásától függ. Ez a tárgyalási mód rendkívül általános, nem korlátozódik intracelluláris és extracelluláris közeg közötti különbségre. Sejtmentes oldatok esetében is jól alkalmazható. A módszer röviden a következő.

Az MR jel spektruma a következő alakban írható fel:

$$s(\omega) = \frac{1}{-i\omega - \Sigma(\omega)} \quad , \quad (29)$$

ahol  $\Sigma(\omega)$  a közeg mérhető jellemzője. Ez a reprezentáció a sok-test probléma részecske propagátorából származik.  $\Sigma(\omega)$ -t saját-energiaként szokás nevezni, ez közvetlenül jellemzi a mezoszkopikus struktúrát szemben az  $s(\omega)$  mennyiséggel, amely egy deformált Lorentz függvény. A porózus közegek vizsgálatánál megszokott módon itt is a diffúziós propagátor elemzése vezet eredményre. A diffúziós propagátor időfejlődése:

$$G(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, t) = \int_{r_0}^{\mathbf{r}} D\mathbf{r}(t) \cdot \exp \left[ -i \int_0^t dt \Omega[\mathbf{r}(t)] - \int_0^t dt \frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{r}}{4D} \right] \quad , \quad (30)$$

ahol  $\Omega(\mathbf{r})$  a Larmor frekvencia változó része:  $\langle \Omega(\mathbf{r}) \rangle = 0$ . Homogén térben ( $\Omega(\mathbf{r}) \equiv 0$ ) diffúziós propagátor Fourier transzformáltja a következő alakot veszi fel:

$$G^0(\omega, \mathbf{k}) = \frac{1}{-i\omega - Dk^2} \quad . \quad (31)$$

A példa kedvéért álljon itt a jel spektrumának diszperzióját leíró sajátenergia képlete, egy egyszerű esetben. Amennyiben a diffúzió a közegben homogén, a közeg mágneses

szempontból inhomogén, gyenge mágneses különbségek mellett a perturbáló saját-energia tag:

$$\Sigma^{pert}(\omega) = -\int \frac{d^3q}{(2\pi)^3} \frac{\Gamma_2(q)}{-i\omega + Dq^2}, \quad (32)$$

ahol  $\Gamma_2(r) = \langle \mathbf{Q}(\mathbf{r})\mathbf{Q}(0) \rangle_r$ , a mágneses inhomogenitás autokorrelációs függvénye,  $\Gamma_2(q)$  pedig ennek térbeli Fourier transzformáltja. (24)-ben az integrálás a teljes Fourier térre történik.

A módszer rendkívüli előnye, hogy az MR jel spektrumának diszperzióját közvetlenül a térbeli mágneses és diffúziós inhomogenitásokkal kapcsolja össze. A modell hátránya, hogy a heterogén közeget teljesen bejárhatónak tételezi fel (vízmolekulák bolyongása), elzárt régiókat (zárt pórusok) nehezen lehet kezelni. Ez a biológiai rendszerekben nem túl erős megkötés. További elvi probléma, hogy a transzverzális relaxációt a szuszeptibilitásbeli inhomogenitáshoz köti, a térfogati (bulk) relaxációval nem számol. Ez tulajdonképpen egy mezoszkopikus skálán lezajló T2\* relaxációt jelent. A homogén közegekben (tiszt víz) nem zérus a relaxáció. Ez a megkötés ugyanakkor elfogadható, mivel a víz T2 relaxációja tiszta vízben jóval nagyobb érték, mint biológiai mintákban. Az Larmor frekvencia térbeli inhomogenitása sokkal gyorsabb relaxációt okoz, ez a meghatározó effektus biológiai rendszerekben<sup>6</sup>.

## Karakterisztikus hossz, $q$ -space

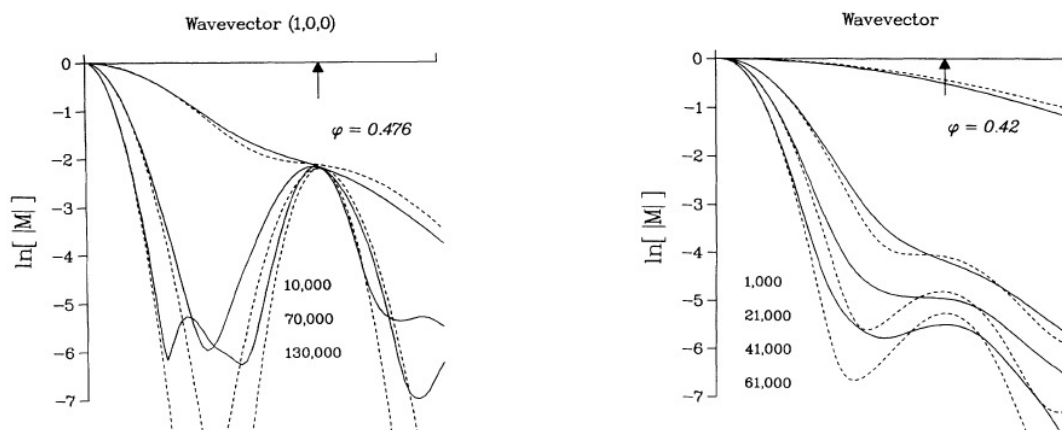
A PFGSE kísérletek eredménye közvetlen információval szolgál a közeg struktúrafaktorára. (ld.: (17) egyenlet). Az MR jel a közegre jellemző diffúziós propagátorfüggvény Fourier transzformáltja. A (18) típusú időfüggő parciális differenciálegyenlet megoldásai alapvetően a (19) egyenletben megfogalmazott határfeltételektől függenek. A megoldások közvetlenül árulkodnak a probléma dimenzionalitásáról, illetve a határfeltétel szimmetriájáról. Másként megfogalmazva, a peremfeltételek, azaz a diffúziós korlátok a diffúziós egyenlet megoldásában megjelennek. A pórusok, mint merev korlátok, illetve egyéb akadályok (permeabilis sejtmembránok) a propagátorfüggvényt meghatározzák. Amennyiben egy karakterisztikus méret megjelenik a közegben (pl. pórus átmérője, pórusokat összekötő

---

<sup>6</sup> E módszerrel kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy a modern fizika eszközeivel dolgozik, az elhanyagolások matematikailag megalapozottak, de ezekhez nem minden esetben társítható egyszerű, klasszikus-fizikai kép. Továbbá spektroszkópián keresztül közelíti meg a problémát, a képalkotásban való közvetlen alkalmazása körülményes.

nyakak hossza, ill. sejtméret, vagy sejtek közötti távolság), ez a diffúziós propagátorfüggvényben is megjelenik.

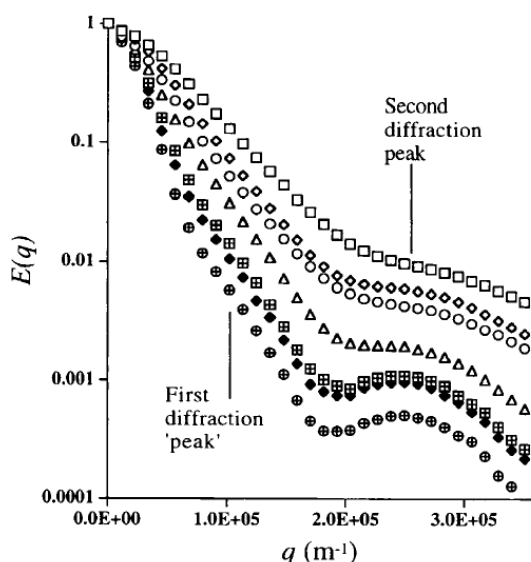
Mitra és munkatársai tanulmányukban összehasonlították az egymással összeköttetésben álló pórusokban való diffúzió analitikus értékelését, valamint e rendszerre végzett Monte-Carlo szimulációk eredményeit [28].



10. ábra – Mitra et al. Phys. Rev. Lett. 1992

A 10. ábra a jelintenzitás ( $M$ ) hullámszámvektor ( $q$ ) függését ábrázolja. A bal oldali ábra egy négyzetrácsos elrendezésű (szigorú geometriai rend) szilárd falú gömbök esetén ábrázolja a jelerősség alakulását, a jobb oldali ábra a je értékének alakulását e gömbök véletlenszerű elhelyezkedése esetén. A szaggatott vonalak az elméleti modellt, a folytonos vonalak a Monte-Carlo szimuláció eredményeit ábrázolják. A különböző görbék rendre nagyobb lépésszámú szimulációhoz, illetve nagyobb diffúziós időhöz tartozó eredményeket ábrázolják. A hullámszámvektor tengelyen a nyilakkal jelölt hely az adott gömbök által elfoglalt térfogatfrakcióhoz tartozó karakterisztikus hullámszámvektor abszolút értékét jelölik:  $k = 2\pi/(2R_0)$ . Jól látható, hogy a szigorú geometriai elrendezéstől eltérő véletlen eloszlású rendszerben is határozottan jelentkeznek azok a csúcsok, amelyek a rendszer karakterisztikus méretét jelölik. Ez a jelenség a Röntgen diffrakciós kísérletek analógiájából merítve a diffúziós diffrakció nevet kapta. Az elméleti és szimulációs eredmények a karakterisztikus méretet illetően nagyon jó egyezést mutatnak. Továbbá a jelmenetek egyezése azt is jelenti, hogy az elméleti modell, amely alapvetően hosszú diffúziós időt tételez fel, a köztes időskálán is elfogadható eredményt ad. A biológiai rendszerekben a karakterisztikus hosszak meghatározása, illetve azok relatív változása fontos indikátora lehet kóros folyamatoknak (sejtduzzadás – citotoxikus ödéma, extracelluláris tér növekedése – vazogén eredetű ödéma, sejtszámban beálló változás – sejtszaporodás, stb.).

Callaghan és munkatársai azonos geometriafüggést találtak, amely ugyanúgy jó egyezést mutatott a számítógépes szimuláció eredményeivel [35]. Kuchel és munkatársai [36] humán VVT szuszpenzió végzett mérései magas  $b$ -érték mellett ( $b > 1500 \text{ s/mm}^2$ ) kimutatták a karakterisztikus hosszt a jelcsökkenésben, valamint annak hematokrit függésére is rámutattak (ld.: 11. ábra).



11. ábra – Kuchel et al. MRM 1997 [36]

a görbék fentről lefelé csökkenő hematokrit számú minták jelintenzitásai a  $q$  értékének függvényében

A 11. ábrán jól látható, hogy a sejtes állomány térfogatfrakciójának (hematokritszám) csökkenésével a karakterisztikus méretet jellemző diffrakciós csúcs egyre markánsabb. Ennek az az oka, hogy a sejtméreten kívül több egyéb méret is jellemző erre a heterogén közegre (pl.: sejtek közötti átlagos távolság). Ezek a méretek azonban egyre kevésbé jellemzőek (ezek eloszlása egyre szélesebb, szórása egyre nagyobb, miközben az átlag is nő hematokritszám csökkenésével), ezért a sejtméret válik a leginkább jellemző méretté.

A karakterisztikus méret megjeleníthető képi intenzitásként is az MR képalkotásban. Ez az eljárás a  $q$ -space imaging alapja [37, 38]. A  $q$ -space az angol terminológiában elterjedt hullámszámvektor jelölésből ( $q$ ) származik (a  $k$  jelölés az MR irodalomban foglalt).

## Célkitűzés

Az elmúlt évtizedekben számos kutatási program és tudományos közlemény tárgyát képezte a víz mikroszkopikus skálán lezajló diffúziója. A különböző tudományterületek számos jelentős eredménnyel járultak hozzá e probléma megértéséhez. A biológiai szövetek vizsgálata, amelyek természetüknél fogva heterogén közegek a víz diffúziójának szempontjából, több szempontból is érdekes eredményre vezetett. Mára nyilvánvalóvá vált, hogy a víz diffúziója megváltozik különböző kóros folyamatok során, mint például stroke, intra- és extracranialis tumorok, metasztázisok, epilepszia [22, 39-42]. A víz diffúziója jól mérhető és jellemezhető Mágneses Rezonancia képalkotással, nem invazív és megismételhető módon. Ugyanakkor, számos esetben nem világos, hogy a víz kóros állapotokban megváltozott diffúziója mögött milyen molekuláris mechanizmusok rejlenek. Például, a látszólagos diffúziós tényező (ADC) csökkenését a stroke esetében az extracelluláris tér víztartalmának csökkenésével és ugyanakkor az intracelluláris tér víztartalmának növekedésével szokás magyarázni (azaz az EC-ből az IC-be áramló víz, azaz citotoxikus ödéma fellépésével) [43]. Számos egyéb elmélet is napvilágot látott. Ilyen az intracelluláris térben az áramlási folyamatok csökkenése – „IC streaming”: [44], a diffúziós mozgás számára rendelkezésre álló térfogat geometriájának változásával – „increased tortuosity”: [45], a sol-gél frakció megváltozásával: [46, 47]. Ugyanakkor a mai napig nem alakult ki konszenzus a stroke esetén bekövetkező diffúziós változások okaival kapcsolatban. Továbbá az a tény, hogy a T2 értékében bekövetkező változás nem korrelál a diffúziós értékben bekövetkezett változással, mindeztidáig magyarázat nélkül maradt.

Az ischiemiás területen az ADC csökkenés 30 percen belül bekövetkezik [1]. A T2WI képeken ez a változás csak órák múlva jelenik meg [1]. Az ADC csökkenés a szürkeállomány esetén lép fel, a fehérállományban az első 30 percen belül nem tapasztalható ADC csökkenés [1]. Ugyanakkor, az epilepsziás gócokban is ADC csökkenés tapasztalható, amelyből az a következtetés vonható le, hogy az ADC az idegsejtek károsodásával együtt jár. Az epilepsziás gócok esetén különös, hogy ezek a területekre általában hiperperfúzió jellemző. Ezt patkányon végzett bicuculline-nel előidézett epilepszia esetében is sikerült igazolni. Ugyanakkor a terület spektroszkópiai vizsgálatával a csökkent ADC, megnövekedett agyi véráramlás mellett az ATP szintje nem változott [1], ami az energiahányos állapotra utalna. Az idegsejtek károsodásának és az ADC csökkenésének viszonyát vizsgálva Kain sav (kainic acid) és rose bengal alkalmazásával ADC csökkenést tapasztaltak [1]. A spektroszkópiai vizsgálatokkal a laktát, nagy energiájú foszfátok időbeli változását követték. Ezzel egyidőben

a pH érték időbeli változását is követték. A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a rövid, 30 perces okklúzióval kiváltott ischemia után a foszfát szintje 10 perc elteltével a normális értékre tér vissza, míg a pH érték csak 20-30 perces késéssel. A laktát szint 40 perc után normalizálódik. A reperfúzió hatására rövid okklúzió mellett az ADC érték is normalizálódik. Az a következtetés vonható le, hogy az ADC változása nem feltétlenül jár sejtkárosodással. A permanens ischemia kialakulásakor a CT képek és a T2 súlyozott MR képek kb. 24 óra után mutatnak azonosságot a diffúzió súlyozott képekkel, ez már az ischemia miatt kialakult élettani folyamatok irreverzibilis tartománya. Az irreverzibilis esetekben az ADC 2-5 napon belül a normálshoz közelítő értékhez tér vissza, azaz növekszik, míg a protondenzitás (és az ezzel szorosabb kapcsolatban lévő T1 relaxációs idő) szintén növekszik. A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpák gátlásával (ouabain-nal indukálva) az ADC értékében 50%-os csökkenés idézhető elő, hasonlóan az ischemiás területeken tapasztaltakkal. Felmerül, hogy az ADC változása citotoxikus ödémával társul, ami az ischemiában gyorsan alakul ki, a vazogén ödéma kialakulása pedig a T2 relaxációhoz társul, amely csak órák alatt alakul ki. Az élettani folyamatok háttérében levő mechanizmusok azonban nem tisztázottak. Több különböző mechanizmus húzódhat meg a háttérben, a kémiai anyagokkal végzett kísérletek során nem bizonyos, hogy ezen anyagok hatása exkluzív. Például az ouabain nemcsak mint  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpa inhibitor, hanem mint ATPase inhibitor is működik [1]. Így nemcsak a sejtek ozmotikus viselkedését, de az energiaellátási folyamatokat is befolyásolja. Ráadásul az ilyen kísérletek esetén a hatóanyagok intracelluláris térbe való bejutását, annak dinamikáját is szükséges lenne vizsgálni.

A stroke során kialakuló ischemia a sejtek energiaellátását jelentősen befolyásolja. A kialakuló ödéma, a szövet makroszkopikus perfúziós tulajdonságán túl, az intracelluláris térben lejátszódó metabolikus folyamatokat is érinti. A sejteken belüli víz mobilitásának csökkenése korrelál a proteinekhez köthető víz ozmotikusan inaktív viselkedésével [48]. A protein-víz kölcsönhatás a víz diffúziójának csökkenésében kulcsszerepet tölt be. E kölcsönhatás vizsgálata azonban a gyors kicserélődési folyamatok miatt nehezen vizsgálható [49]. Az ozmózással kapcsolatban az intracelluláris víz egy jelentős része közvetlenül proteinekhez köthető [50]. Bizonyos traumák és ischemia esetén ozmotikusan nem reagáló agyi ödéma alakul ki és ugyanakkor az MR képalkotásban az érintett területen csökkent ADC érték található [51-53]. Az ozmotikus kísérletek a víz állapotának felmérésében kulcsszerepet játszanak.

## **Motiváció**

A VVT szuszpenziók jó szöveti modellként szolgálnak az ozmotikus viselkedés, ADC változások és relaxációs változások tanulmányozásában [22, 43]. A sejtméret, membrán permeabilitás, intracelluláris térfogatfrakció, extracelluláris térben oldott fehérjék koncentrációja és minősége, valamint az extracelluláris tér ionkoncentrációja egymástól függetlenül változtatható.

A szakirodalomban elterjedt módszer a sejtek eritrocita ghost-okkal való helyettesítése. Ez a módszer valójában a lehető legdurvább beavatkozás a sejtek életébe. A sejtek semmilyen szempontból nem tekinthetők oldatokat tartalmazó, lipid kettősréteggel határolt „zsákoknak”. Nemcsak a membrán funkcionalitása különbözik drasztikusan az élő sejtektől, hanem az intracelluláris tér is. Az ionpumpák funkcionalitása nyilvánvaló nem tekinthető intaktnak. A membrán tulajdonságai részben a transzmembrán fehérjéknek, részben egyszerű mechanikai körülményeknek köszönhetően erősen befolyásolják az intracelluláris tartomány szerkezetét és ezen keresztül a funkcionalitását is. Az intracelluláris tér helyettesítése oldatokkal kézenfekvőnek látszik, hiszen így az oldott anyag koncentrációja, minősége szabadon, kontrolláltan változtatható. Az IC tér modellezése oldatokkal azonban túlságosan durva közelítés. Az IC tér koncentrációja nem közelíthető oldatokban, az oldott anyagok kölcsönhatása végképp nem. Ahhoz, hogy a szöveteket minél inkább közelíteni lehessen egy sejtszuszenzióval, működő, intakt sejtek alkalmazására van szükség.

A sejtmembrán funkcionalitása befolyásolható sejtszuszenzióhoz adott ouabain-nal ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpák gátlása, ATPase gátlás) [1]. A sejtmembrán víz permeabilitását pCMBS hozzáadásával lehet befolyásolni [22]. Ezen eljárások során alkalmazott kémiai anyagok hatásmechanizmusa ismert, ugyanakkor nem zárható ki, hogy a kívánt hatások mellett egyéb mellékhatások is fellépnek.

Célszerű olyan kísérleti módszereket választani, amely során a normális körülményektől a lehető legkevésbé térünk el. Természetesen adódik az olyan extracelluláris paraméterek változtatása, amelyek a normál körülmények között is változhatnak, és amelyek változására a sejtek kontrollálható határok között rezisztensek. Ilyen lehet az extracelluláris tér ionkoncentrációja, oldott fehérje koncentrációja, az oldott fehérjék minőségének változása. Az extracelluláris tér diffúziós és relaxációs paramétereinek változása egyszerű oldatkísérletekkel meghatározható.

Az extracelluláris mátrixhoz való kapcsolódás a sejtek életében meghatározó lehet, biofizikai szempontból megengedhető, hogy a szöveti EC teret egy in-vitro módon előállított oldattal,

illetve géllal lehessen helyettesíteni. Az oldatokkal végzett kísérletek támpontot adhatnak abban, hogy hogyan befolyásolja az oldott anyag az oldószer víz diffúzióját és relaxációját. Az EMT modellben például, az EC és IC tartomány külön-külön, diffúziós és relaxációs szempontból, mint homogén közeg szerepel. Az oldott anyagok molekuláinak karakterisztikus mérete, hidrofilitása, relaxációs helyeinek minősége befolyásolják a víz diffúziós és relaxációs tulajdonságát. E terekben beálló változások (proteinek felszaporodása, proteolízis termékek megjelenése, sol-gel fázisátalakulások, gél mátrixának hálómérete stb.) jól modellezhetők egyszerű koncentrációváltozással, oldott anyagok méretének változtatásával, cross-linker-ek alkalmazásával, ionkoncentráció változtatásával. Ezek a paraméterek jól köthetők ugyanakkor bizonyos kóros folyamatokhoz. Az egyszerű koncentrációváltozás a diffúzió változásához vezet, a Brown-mozgás számára rendelkezésre álló tér megváltozása miatt. Ugyanakkor a relaxációs helyekhez közeli térfogattartomány (hidratációs rétegek) és az attól távoli (bulk) térfogat aránya is változik, ez az egész oldatra átlagolt relaxáció értékét befolyásolja. Az egyszerű koncentrációváltoztatás mellett elvégzett kísérletek a diffúzió és relaxáció értékének változását követi nyomon, a beálló relatív változások összevethetők az élő szövetekben beálló változásokkal. E homogén rendszereken végzett kísérletek eredményei a heterogén rendszerek modelljeinek fontos bemenő paraméterei. Az oldott molekulák minőségének változtatásával olyan folyamatokat lehet modellezni, mint az intracelluláris térben történő, protein degradációval járó folyamatok, illetve a sejtfázisra, vagy sejt és extracelluláris mátrix kapcsolatára jellemző szerkezeti változások (szintézis, befűződés, filopodiumok megjelenése stb.). A fehérjéről általában elmondható, hogy külső felületük hidofil, belső tartományuk kevésbé hidofil. A fehérjék degradációja lép fel a cytotoxikus oedema esetén. A különböző fehérje származékokkal, illetve szintetikus molekulák oldatával végzett kísérletek e változásokat modellezik. Így összefüggésbe hozhatók a diffúziós, relaxációs értékek valamint az oldott anyagok hidrofilitása.

A heterogén közegek vizsgálatának következő lépése az intracelluláris és extracelluláris tartomány egymástól független változtatása, amelyben az IC tartomány állapotának rögzítése mellett a szuszpenzió EC tartományának változtatása történik az oldatok esetében leírt módon. Mivel az elméleti modellek és az azok alapjául szolgáló kísérleti eredmények a két tartomány erős összefüggését jósolják, érdemes a vízkicserélődés hatását vizsgálni. Az élő rendszerekben több mechanizmus egyszerre léphet fel, a sejtsuszpenziók vizsgálatánál azonban a jelenségek szeparálhatók. A citotoxikus ödéma esetén többről van szó, mint egyszerű vízáthelyeződés az EC-ből az IC tartományba. Ez lehet annak a folyamatnak az eredménye, hogy az IC tartományban fellépő proteolitikus folyamatok az IC tartományban



oldott molekulák által „kötött” víz mennyiségét megnövelik (ozmotikusan inaktív víz, megövekedett relaxivitás és csökkent diffúziós érték), miközben az EC tartomány megövekedett oldott anyag koncentrációja ugyancsak csökkent diffúzióhoz vezet. Ez megmagyarázná, hogy miért vezet a cytotoxikus oedema csökkent ADC értékhez. Amennyiben csak beáramlásról van szó, akkor az IC tartományban az ADC értéke növekedne, az EC tartomány ADC értéke csökkenne. Az eredő ADC értékre nézve nehéz levonni egyértelmű következtetést, hiszen a két mechanizmus hatása egymást gyengíti. A heterogén szuszpenzió vizsgálata ugyanakkor rámutathat arra, hogy az IC és EC tartományokban beálló ADC és T2 változások milyen mértékűek, valamint arra, hogy egyáltalán van-e remény intracelluláris történések (sejtciklus változások) nyomonkövetésére reális jel-zaj viszonyok mellett a diagnosztikai *b*-érték tartományában. Ugyanezek a vizsgálatok arra is rámutathatnak, hogy az intracelluláris tér fehérje állományában bekövetkező változás tetten érhető-e diffúziós illetve relaxációs mérésekkel. Ez a lehetőség az onkológiai diagnosztikában siker esetén igen nagy jelentőséggel bírhat.

Az IC tér manipulálása jóval bonyolultabb feladat. Amennyiben a módosítás során életképes sejtek állnak elő, amelyek funkcionalitásukban és sejtbiológiai kísérletekkel ellenőrizhető paramétereikben közel azonosak a nem módosított sejtekhez képest, valamint a módosított fehérjeállomány kontrollálható változáson megy keresztül, akkor feltételezhető, hogy az IC tartomány változása a többi biofizikailag releváns paraméter változását nem vonja maga után. Ehhez hasonló lehetőség különböző fajok azonos funkciójú sejtjeinek vizsgálata. Amennyiben az adott sejtek működése és külső behatásokkal szembeni viselkedése jól ismert, akkor az ezeket tartalmazó sejtsuszpenziókon végzett ozmotikus kísérletek és az így nyert diffúziós és relaxációs paraméterek, valamint azok változásai összehasonlíthatók.

További lehetőség a sejt saját életciklusa során bekövetkező változásokat követni, külső művi beavatkozás nélkül az intracelluláris tér változása mellett a diffúziós és relaxációs paraméterek változása is követhető.

## **Intracelluláris crowding**

Az emlős vörösvértestek nagy variációt mutatnak térfogatukat és víztartalmukat, és az ozmotikus kihívásokkal szembeni rezisztenciájukat tekintve is nagyon különböznek. Ugyanakkor nagyon hasonló plazma ozmolaritásukat tekintve (~300 mOsm) [54]. A tevé és rokon emlősök VVT-i rendkívül rezisztensek az ozmotikus behatásokkal szemben. A különböző fajok hemoglobinjuk szerint is különböznek, a tevéfélék hemoglobinja több

hidrofil aminosavat tartalmaz, mint a többi emlősé. Továbbá a teve hemoglobin magasabb izoelektromos pontja alacsonyabb intracelluláris Na és K tartalomhoz vezet [55]. A hemoglobin molekulák magasabb hidrofilitása magasabb kötött víztartalomhoz is vezet, amely nagyobb mennyiségű ozmotikusan inaktív IC vízzel párosul [56]. Az intracelluláris tér protein-víz interakciója a teve fajták VVT-iben erősebb (fajlagosan több víz társítható a hidratációs réteghez, illetve a tartózkodási idő ezekben a rétegekben hosszabb). A víz diffúzióját a protein-víz interakció korlátozza. Feltételezhetően a teve félék VVT szuszpenziójában alacsonyabb az IC térben a diffúziós tényező, más fajok VVT szuszpenziójához képest.

A modellkísérlet párhuzamba állítható a klinikai tapasztalatokkal. Bizonyos traumás illetve ischémias esetben kialakuló agyi ödémában az érintett területek víztartalma gyógyszeresen nem csökkenthető (ozmotikusan inaktív víztartalom), ugyanakkor a területen mért ADC érték csökken.

A különböző fajok VVT szuszpenziói modellezik az érintett ill. normál szöveteket. Ez a modell élő intakt sejtekből áll, a normálhoz közeli környezetben, ami a ghost-okkal, illetve pl. az ioncsatorna inhibitorokkal végzett kísérletekhez képest előnyt jelent. Ugyanakkor a különböző fajok VVT-inek különbsége több paramétert is érint, amelyek fontosak lehetnek a víz diffúzióját illetően. A mintákat alkotó VVT-k nem csak hemoglobinjuk minőségében különböznek, de sejt méretük, a sejtek alakja, valamint membrán permeabilitásuk is különböző lehet. A sejtmembrán permeabilitásának hatásának vizsgálata ugyanakkor arra mutatott rá, hogy a fajok közötti, az ozmotikus rezisztenciában megtalálható különbség elsődleges oka a protein-víz interakcióban, nem pedig a membrán permeabilitásban keresendő [56]. A modellkísérlet célja az intracelluláris térben található víz diffúziója és a protein-víz interakció közötti összefüggés felderítése.

## **Proteolízis modell**

Az ischemia által érintett területeken a sejtek energiaellátása súlyosan sérül. Az ischemia hatására az IC és EC terek víztartalma változik, amely a diffúziós és relaxációs paraméterek megváltozásával járnak. Ezzel párhuzamosan az intracelluláris valamint a transzmembrán proteinek degradációja következik be. A proteolízis folyamatának gátlásával az érintett állomány sejtszelei megóvhatók [77]. A sejtmembrán permeabilitásának megváltozása, valamint az intracelluláris térben a protein-víz kölcsönhatások megváltozása párhuzamosan lezajló folyamatok. A diffúzió és relaxáció szempontjából mindkét folyamat fontos szerepet játszik, a

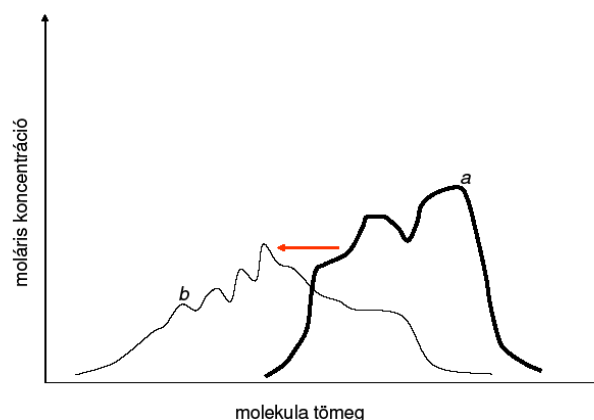
két folyamat párhuzamosan zajlik, hatásuk nehezen szétválasztható. Szükséges tehát e folyamatokat egymástól függetlenül megvizsgálni. Az oldatokkal végzett kísérletek annak a jelenségnek a felderítését is célozzák, amely az intracelluláris tér megváltozott fehérjeállományával kapcsolatos. Az intracelluláris tér, in-vitro módon, oldatokkal csak igen közelítőleg modellezhető. Az IC tér molekuláinak néhány karakterisztikus sajátossága és azok diffúzióra és relaxációra gyakorolt hatása vizsgálható, amelyekből korlátozott érvényességgel ugyan, de következtetéseket lehet levonni az élő sejtek megváltozott fehérjeállományának hatására vonatkozóan is. Ez a célja a proteolízis modellkísérleteknek.

Normál sejtfunkciók mellett elmondható, hogy a proteinek külső felülete inkább hidrofíli, a belső tartományok pedig kevésbé hidrofíli jellegűek. A degradáció során az IC tartomány oldott molekuláit illetően feltételezhető, hogy kevésbé hidrofíliekké válnak (ld. Intracelluláris crowding kísérletek). Ugyanakkor elmondható, hogy a sejtek energiahány miatt fellépő degradációja a proteinek darabolódásával jár, azaz az oldott molekulák mérete is változik, amely az IC-ben levő szabad víz számára megváltozott kölcsönhatási lehetőségeket jelent. Ez a relaxációra és a diffúzióra is hatással van. Az oldatok szintén nem tekinthetők homogén közegnek az oldószer víz szempontjából, hiszen az interakciós helyek, hidratációs rétegek különböznek térfogati (bulk) víztől. Az elméleti előzmények fejezetben említett modellek nem terjednek ki az ilyen mikroszkopikus léptékű heterogenitás tárgyalására. E problémák szigorú tárgyalása, nem történhet klasszikus fizika analógiák alapján, a kvantummechanika eszközeit és eredményeit kell használni. E tárgyalásmódban lehetséges a sok mikroszkopikus kvantumrendszerből álló makroszkopikus inkoherens sokaság tárgyalása [57]. A szigorú és korrekt tárgyalás és jelen kísérleti modellek eredményei közötti kapcsolat megteremtésének feladata túlmutat jelen tanulmány keretein. Az oldott anyagok koncentrációváltozásának, illetve minőségének változása hatására bekövetkező relaxációs idő, valamint ADC változás feltérképezése kísérleti feladat.

Az intracelluláris tér koncentrációváltozása két különböző módon történhet. Az egyik lehetőség a sejtek duzzadása IC proteolízis nélkül, ez EC→IC vízáramlás esetén léphet fel, pl. ozmotikus körülmények megváltozása miatt (EC tér ionkoncentráció változik, ill. ionpumpák funkciója sérül). Ez az IC tér szabad víztartalmának változását jelenti. A másik lehetőség merőben más folyamat. Az IC tér proteinjai nem tekinthetők oldott molekuláknak, szerkezetileg kompakt és kölcsönható molekulákról van szó. Ez a kompaktság a proteolízis során megszűnik. Ekkor a teljes IC proteintartalom nem változik, mégis úgy tekinthető, hogy az oldott anyag tartalma megnő. Egy nagyon egyszerű példával élve, egy adott térfogatú vízhez adott kristályos NaCl az oldódás előtt és után ugyanazzal a NaCl (tömeg/víz térfogat)

koncentrációval jellemezhető, ugyanakkor nyilvánvaló a különbség a két állapot között. Erre a félrevezető koncentráció-fogalomra hívja fel a figyelmet tanulmányában [2]. Hipotézisünk szerint a citotoxikus ödéma nem egyszerű vízáthelyeződés az EC térből az IC térbe. Az IC térben lezajló proteolízis miatt megváltozott ozmotikus viszonyok miatt az IC térben az oldott anyag koncentrációja megnő, ami nagyobb kötött vízmennyiséghez vezet. Ez az ozmotikus egyensúly fenntartása miatt EC→IC vízáthelyeződéssel jár, ugyanakkor az IC térben ez nem vezet magasabb szabad víztartalomhoz. Amennyiben az ozmotikus egyensúly is felborul, ez a folyamat akár alacsonyabb szabad víztartalomhoz is vezet. Természetesen az ozmotikus egyensúlyban nemcsak az IC proteinek, hanem  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  ionok is részt vesznek, ezek áramlásában pedig az ionpumpák. A sejtdegradáció során e pumpák funkcionalitása is sérül. Ezt támasztják alá a patch-clamp kísérletek, amelyek a sejtvez változásai és az ionpumpák funkciója közötti kapcsolatra mutatnak rá [58].

A proteolízis során az IC tér fehérjeállománya (illetve fehérjeszármazékok) nemcsak koncentrációjában, hanem minőségében is megváltozik. A citoszkeleton struktúrájához nem tartozó, most már oldott fehérjeszármazékok molekuláinak mérete is csökken. A fehérjeállomány spektruma (moláris koncentráció eloszlás a molekulatömeg függvényében) eltolódik. Ezt a folyamatot illusztrálja a 12. ábra. Az ábrán *a* és *b* görbék alatti terület változatlan, amennyiben EC→IC vízáthelyeződés nem történik. Vízáthelyeződés esetén a *b* görbe alatti terület kisebb, mint az *a* görbe alatti terület. A piros nyíl jelzi a folyamat időbeli irányát.



**12. ábra – a proteolízis során bekövetkező oldott anyag tartalom spektrális változásának illusztrációja**  
(a és b görbék alatti terület itt azonos, ami a víztartalom változatlanságát jelenti)

A proteolízis modellkísérletekben a különböző méretű molekulák oldata ADC és T2 értékének vizsgálata a 12. ábrán illusztrált folyamat hatásait vizsgálja.

A korai ischemiás területek MR képalkotás leletei az ADC csökkenés mellett nem mutatnak T2 érték változást. A proteolízis modellkísérletek célja az oldott anyag koncentráció és minőség mellett a T2 és az ADC érték változásának feltérképezése. A modell IC, EC tér jelenlétére vonatkozóan homogénnek tekinthető, ugyanakkor az IC tér változásai a sejtes állomány T2 és ADC értékeire is kihatnak. E modellkísérletekből kvalitatív következtetéseket lehet levonni a sejtes állományú heterogén közegek viselkedésére.

### **Intra és extracelluláris tér hatása az MR jelintenzitásban**

A modellkísérletek egy másik szintje az extracelluláris és intracelluláris tartománnyal egyaránt rendelkező heterogén közegek vizsgálata. A sejtes állománnyal rendelkező szöveteket jól modellezzik a VVT szuszpenziók. A vízmolekulák az EC és IC tartományokat egyaránt bejárják a kísérlet ideje alatt. Az MR jelek változásában az EC és IC tartományok egyaránt szerepet játszanak. Amennyiben a sejtmembránok átjárhatóak, az egyes tartományok egyedi vizsgálata csak részben ad választ a heterogén rendszer ADC és T2 értékének változására. Az extracelluláris térben oldott molekulák koncentrációja és minősége tág tartományban változtatható. Az intracelluláris tér koncentrációját reverzibilis módon lehet befolyásolni az extracelluláris tér ionkoncentrációján keresztül. Az ischemia során reverzibilisen és irreverzibilisen módosuló tartományok alakulhatnak ki. Az IC ozmotikus úton való manipulációja a reverzibilis folyamatokat modellezi. Az ödémás területeken az EC és IC terek térfogataránya megváltozik. Az IC tartomány térfogatfrakciója a szuszpenziók esetén függetlenül változtatható a hozzáadott EC térfogattal. Az EC és IC terek térfogatarányának hatása a mért ADC és T2 értékekre függetlenül vizsgálható a sejtmérettől és az IC tér koncentrációjától. A modellkísérletek célja a következő paraméterek hatásának független vizsgálata a diffúziós tényezőre és a relaxációs időkre: IC tér térfogatfrakciója, EC tér vízkoncentrációja, EC tér oldott anyag minősége, IC tér vízkoncentrációja. A modellkísérletek arra is keresik a választ, hogy az IC és EC térben bekövetkező, egymástól független változása külön-külön milyen mértékben és milyen irányban befolyásolja az MR mérések eredményeit. A citotoxikus ödéma esetén e folyamatok egymással párhuzamosan folynak le. Kérdés, hogy a diffúziós és relaxációs paraméterek változásában tetten érhetők-e ezek a folyamatok külön-külön, vagy éppen egymást gyengítő hatásokról van-e szó? Ilyen

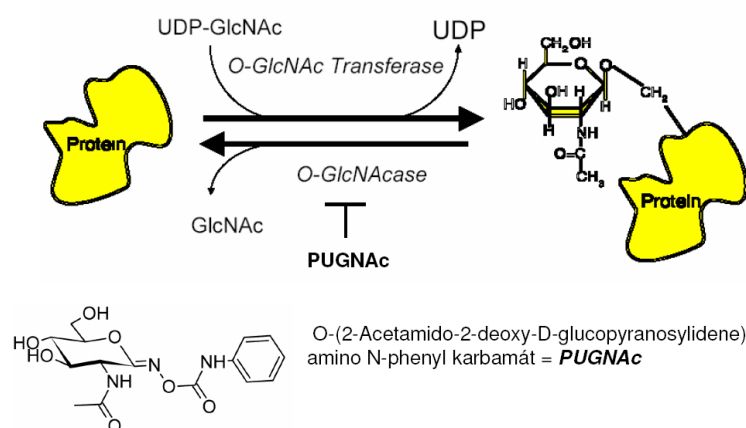
módon e modellkísérletek az MR mérésekből levonható következtetések érvényességét teszteli. A modellkísérletek további célja, hogy a kísérleti eredményeket az elméleti modellekkel összevesse. Elfogadható egyezés esetén az elméleti modellek összetett folyamatok diffúzióra és relaxációra való hatását jól modellezheti. A VVT szuszpenziós kísérletek nem konkrét összetett patológiai mechanizmusokat modelleznek, hanem azok függetleníthető folyamatainak egyedi hatását azonosítják.

## **Intracelluláris tér módosulásainak hatása a diffúziós és relaxációs paraméterekre**

A VVT szuszpenzióval végzett kísérletek és az elméleti modellek alapján elmondható, hogy az intracelluláris tér fehérjeállományában bekövetkező változások a teljes szuszpenzióan mért ADC és T2 értékeket befolyásolja. Az összefüggések felderítésére és az elméleti modellek alkalmazhatóságának igazolására a VVT modellek megfelelőek, ugyanakkor az in-vivo IC történések modellezésére csak részben alkalmasak. Az in-vivo történések modellezésének alkalmasabb módja lehet egy alaposan tanulmányozott, tenyésztethető, kontrollált sejtvonal sejtjeiből (HeLa, Jurkat) előállított szuszpenziók vizsgálata. A következő két kísérletcsoport ilyen sejtsuszpenziók vizsgálatát tűzte ki célul. A következő kísérletek olyan jól ismert folyamatok vizsgálatát célozzák, amelyekben az intracelluláris tér változása nyilvánvaló és kontrollálható.

### *O-glükolizáció hatása az IC vízterekre*

Az intracelluláris fehérjék O-glükolizációja dinamikus, reverzibilis folyamat, amely során glükozamin csoport kapcsolódik, illetve válik le a fehérjékről. Ez a folyamat egy reverzibilis jelátviteli mechanizmus, amely számos sejtélettani folyamatban megy végbe. Szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, az akut stresszállapotok során, a tumorgenezis során és az apoptózis folyamatában. Ugyanakkor az olyan kóros állapotok kialakulásában is részt vesz, mint a diabétesz, gyulladásos folyamatok, valamint az ischemiás területeken a reperfúzió során kialakuló károsodás. Az O-glükolizáció az IC fehérjetartalmának több alkotóelemét érinti. A O-glükolizáció enzimek által vezérelt egyensúlyt módosítja az IC térbe juttatott többlet glükóz, vagy glükozamin (GlcNAc). Az egyensúly eltolódását ugyanakkor a glükozamin fehérjéről való leválását szabályozó enzim gátlása PUGNAc segítségével. A 12. ábra illusztrálja az O-glükolizáció folyamatát.



13. ábra – A fehérjék O-glükolizációja, forrás: dr. Nagy Tamás

A glükózamin felszaporodása az IC proteinek és a víz kölcsönhatását módosítja. A kísérlet célja annak vizsgálata, hogy a fehérjék módosulása a sejt víztereit milyen mértékben módosítja, ozmotikus rezisztenciában okoz-e változást, sejtméret változással jár-e, valamint, hogy ez a módosulás az IC térben detektálható-e MR mérésekkel. Sejtszuspenziós modellrendszerrel vizsgáltuk a diffúziós és relaxációs tulajdonságok változását.

Mivel az O-glükolizáció számos kóros folyamatban előfordul, valamint a mechanizmusa jól ismert, ez a modellkísérlet valódi mechanizmusok MR detektálhatóságát vizsgálja. Ez a modell Jurkat (humán T-sejt leukémia eredetű sejtvonal) sejtek szuspenziójával történt. A kísérlet alapjául, a diffúziós és relaxációs viselkedés detektálhatóságát illetően, a VVT szuspenziókon végzett mérések eredményei és módszerei szolgáltak.

#### *Sejtciklus hatása az IC vízterekre*

A sejtek osztódással való szaporodása szigorú ciklusba rendeződött lépéseken keresztül történik. A sejtciklus során számos drámai változás megy végbe a sejtekben. A sejtciklus M, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> fázisai a DNS állomány nyomon követésével jól azonosíthatók. A sejtmagban lezajló szintézis folyamata, a citokinézis stb. olyan folyamatok, amelyek kétségtelenül érintik a sej víztereit, az intracelluláris protein-víz kölcsönhatást. Egy sejtszuspenzióban a sejtek populációjában a sejtciklus fázisai időhosszuknak megfelelő arányban fordulnak elő. Ez az eloszlás nem változik időben, a sejtek száma időben exponenciálisan nő. A sejtek szinkronizálásával előállítható olyan sejtszuspenzió, amelyben egy adott fázis van csak jelen (a szinkronizáció tökéletességétől függően). Egy ilyen módon előkészített populációban követhető, hogy a sejtciklus mely szakaszában tartanak a sejtek. Amennyiben van olyan fázis, vagy azon belüli szakasz, amelyben a diffúziós és relaxációs paraméterek a többi szakasz

értékeitől szignifikánsan különböznek, ez a szinkronizált populációban tetten érhető. Mivel a sejtciklus során drasztikus IC tartalomváltozások zajlanak le, ezért jó esély van egy, vagy akár több fázis, vagy szakasz azonosítására MR mérésekkel. A normál szövetekben ilyen fokú szinkronizáció nem fordul elő. In vitro sejtenyészetekben azonban számos eljárás áll rendelkezésre a szinkronizáció elérésére. A legegyszerűbb a sejtek kiéheztetése, amellyel a szintézis bizonyos folyamatai leállnak. Ilyen módon elérhető, hogy a minimális tápanyagszükséglet rendelkezésre bocsátásával a sejtek életben maradjanak, ugyanakkor a sejtciklus egy szakaszán felsorakozzanak. A tápanyag további szükséges szintre emelésével a teljes populáció azonos fázisban továbbhalad a sejtciklus szerint. A szinkronizáció akár két teljes ciklus ideje alatt is fennmaradhat. Hasonlóan reverzibilis módszer a mikrotubulusok polimerizációjának reverzibilis gátlása, amely a mitózis fázisában sorakoztatja fel a sejtpopulációt. A gátlás megszűntével a sejtciklus újraindul. Egyéb szelektív eljárások is alkalmazhatók, ilyen a citotoxikus szerek, illetve ionizáló sugárzás alkalmazása. Ez utóbbi módszerekkel a sejtciklus adott fázisára (szakaszára) specifikusan, sejtpusztulás érhető el, amely a sejtpopuláció fázis szerinti eloszlását szűkíti. In-vivo kemoterápiás szerek esetén is tapasztalható szinkronizációs hatás. A sejtszinkronizációs kísérletek célja szinkronizált sejtek szuszpenziójának ADC és T2 értékeinek vizsgálata. A kísérletek célja igazolni, hogy a sejtfázisok megkülönböztetése lehetséges heterogén közegben. Az in-vitro kísérletek egyrészt támaszkodnak a VVT szuszpenzió végzett mérésekre, másrészt a módosult IC terű Jurkat sejtekkel végzett kísérletekre. A sejtszinkronizációs kísérletek legfőbb motivációja felderíteni annak a lehetőségét, hogy a kemoterápiás szerek szinkronizáló hatását in-vivo, nem invazív MR képalkotási eljárással lehessen vizsgálni. A kísérletek eredményessége esetén felmerülhet a kemoterápia és sugárterápia összehangolt alkalmazásának lehetősége, amely kellő fokú szinkronizáltság esetén a sugárterápia hatásfokát 10-30%-kal is növelhetné, így lehetővé tenné a klinikai értelemben hatásos dózis növelését.

## **Eszközök és módszerek**

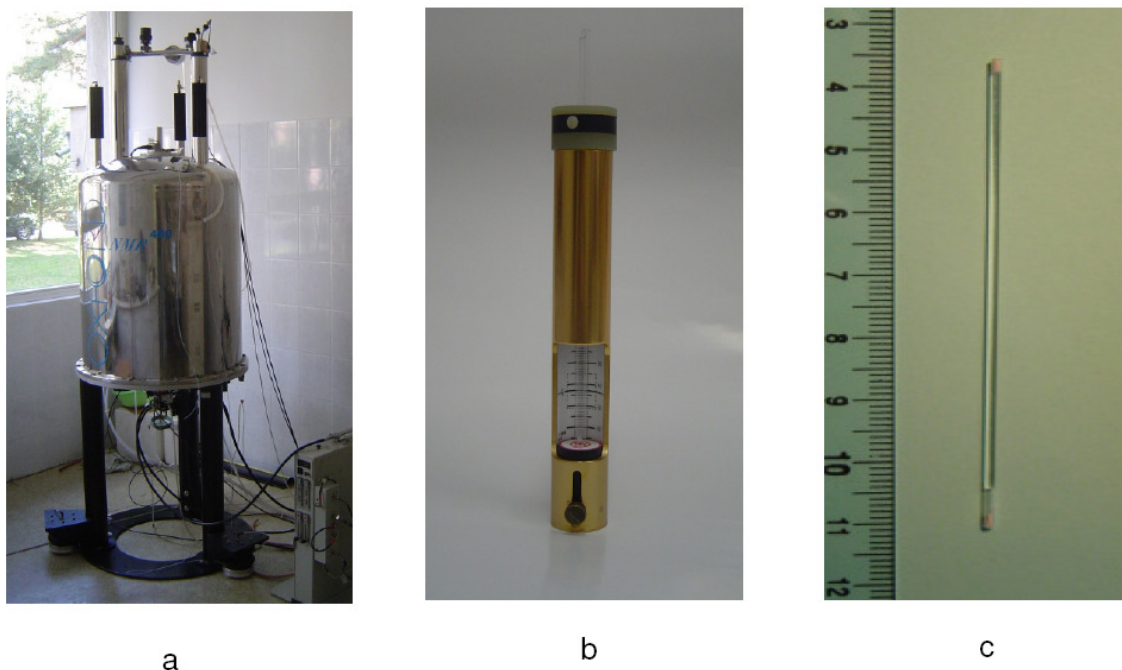
### ***MR technikák***

Az intracelluláris crowding kísérletek MR képalkotás módszerrel, az oldat kísérletek, az EC/IC tér szerepét vizsgáló kísérletek, valamint az intracelluláris tér módosulásait vizsgáló kísérletek spektroszkópiai eljárással történtek. Minden MR kísérlet Varian<sup>UNITY</sup> INOVA 400 WB spektrométerrel történt (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). A mágnes típusa 89 mm bore



méretű, függőleges elrendezésű 9,4 T térerősségű Oxford mágnes (Oxford Instruments Ltd., UK).

A spektroszkópai mérések gerjesztő és kiolvasó mérőfeje 5 mm mintatér átmérőjű ID-PFG típusú volt (Varian). A minta a berendezéshez rendszeresített MR kompatibilis csövekben, hematokrit kapillárisokban foglalt helyet. A kapillárisok alkalmazását a minta mennyiségének csökkentése tette szükségessé. Valamint szükséges volt a vízjel nagyságát a berendezés optimális érzékenységi tartományába hozni. A csökkentett vízmennyiség jele így 0-20 dB hardveres attenuáció mellett jeltorzítás nélkül mérhető volt minden vizsgált mintában. A kapillárisok nem MR méréshez készültek, a mérés során a jelcsökkenést nem befolyásolták a kísérleteket megelőző kalibrációs mérések tanúsága szerint. A kapillárisok a vérminták esetén megszokott módon gyurmadugóval mindkét végükön le voltak zárva a minta szivárgását elkerülendő. A kapillárisokba való felszívás a mintákat tartalmazó 1 ml-es eppendorf csövekből történt a felületi feszültség hatásának segítségével. Így az esetlegesen a mintatartó kapillárisba kerülő buborékok is elkerülhetők voltak az esetek döntő többségében. A buborékos minták nem kerültek felhasználásra.

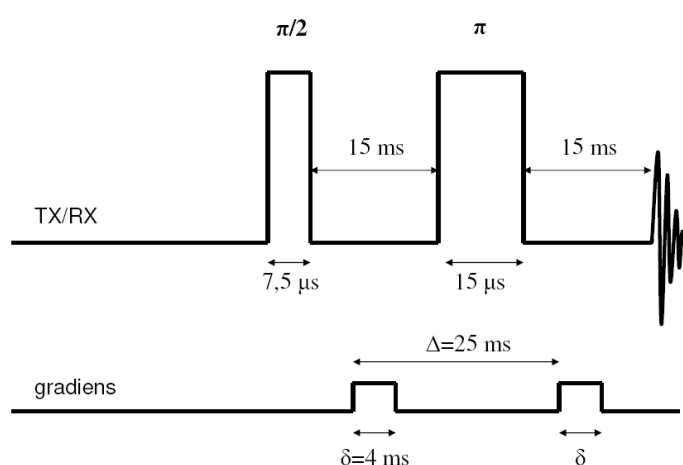


14. ábra – mágnes (a), mintatartó (b), kapilláris (c)

A minta behelyezését követően a rendszer manuális frekvenciahangolása történt. A hangolást követően auto-shimming eljárással a mágneses tér mintatérben való homogenizációja (shim)

történt. Az eljárás a Varian szoftvercsomag alkalmazásával történt (Vnmr 6.1C gzmap). A shimming procedúra során a szemmel nem látható légzárványok, buborékok is észlelhetők voltak. Amennyiben a shim procedúra az így fellépő, mintán belüli szuszceptibilitás különbségekből adódó mágneses tér inhomogenitásokat nem tudta kiküszöbölni, a minta nem került felhasználásra. A shimming után az RF kalibráció történt a 90°-os pulzus meghatározására. A 90°-os pulzus meghatározása (RF kalibráció) a vízjelre, inverziós technikával történt.

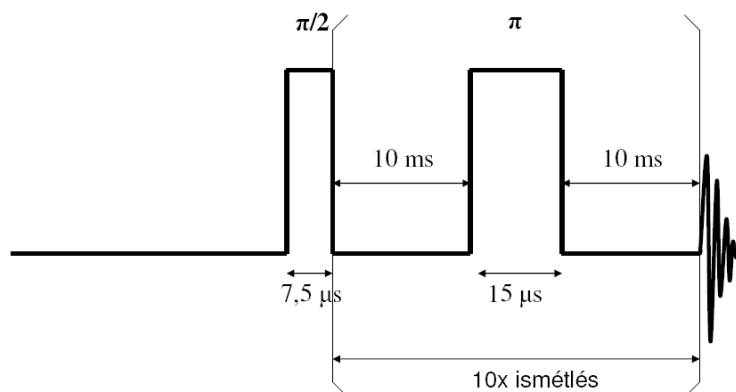
Az effektív diffúziós tényező meghatározása PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin Echo) szekvenciával történt (ld.: 15. ábra).



15. ábra – PFGSE szekvencia, a mérésekben használt jellemző paraméterekkel

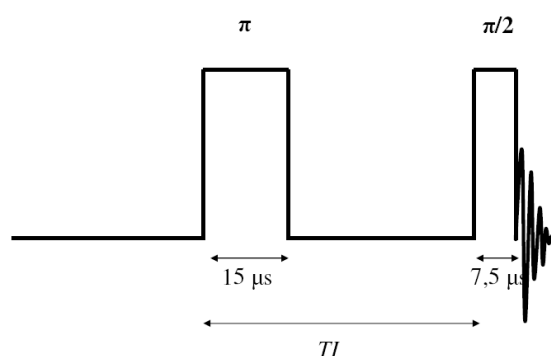
A mérésekben a gradiens hossza  $\delta = 4$  ms, a gradienspár távolsága  $\Delta = 25$  ms volt. Hét gradiens echo került detektálásra változó gradiens erősség mellett, amely a 25-180 mT/m tartományba esett ( $b$ -érték  $< 3000 \text{ s/mm}^2 = 0,3 \cdot 10^{10} \text{ s/m}^2$ ). A gradiens erősségének tartománya a kísérletek során azonos volt (VVT, sejtszuszpénzió, oldatok esetén külön-külön), annak érdekében, hogy a mérési tartomány azonos diffúziós sebességek detektálását tegye lehetővé, elkerülendő az esetleges módusokból származó torzításokat. Az exponenciális lecsengés ( $b$ -érték függvényében) kellő mértéke szükséges az illesztés pontosságának növeléséhez. A jelcsökkenés kb. egy nagyságrend volt, de mindig meghaladta az  $1/e$  értéket. A spektrális görbék alatti területek logaritmusa a gradiens erősségének függvényében került ábrázolásra. Lineáris illesztés után (legkisebb négyzetes eltérések módszerével, Varian post-processing alkalmazás), az exponens meghatározásra került.

A T2 relaxáció meghatározása CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) szekvenciával történt, ld. 16. ábrán.



16. ábra – CPMG szekvencia, a mérésekben használt jellemző paraméterekkel

A  $\pi$  pulzusok között eltelt idő  $12 \text{ ms}$  volt, és egy  $10$  tagú  $\pi$  pulzussorozat szerepelt a szekvenciában. A pulzussorozat hossza a mintától függően egy pilotmérésben került beállításra. A pulzussorozatban a jelcsökkenés mindig meghaladta az  $1/e$  értéket. A mért jelintenzitás exponense a fentiekhez hasonlóan lineáris illesztéssel került meghatározásra. A T1 relaxációs érték meghatározása inverziós technikával történt (ld. 17. ábra).



17. ábra - Inverziós szekvencia, a mérésekben használt jellemző paraméterekkel

A mérések  $(25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$  -on történtek. Az ADC, T1 és T2 mérések hibája a nemlineáris legkisebb négyzetek módszerével történő illesztés hibájából származott, ez átlagosan 2%-3%

volt, de minden esetben kisebb volt mint 4%. A jel-zaj viszony a spekroszkópiában elvárt módon messze 10 fölött volt minden esetben.

A képalkotó mérések gerjesztő és kiolvasó eszköze, 35 mm mintatér átmérőjű multinukleáris, Litz térfogati tekercssel és aktív árnyékolással ellátott mérőfej volt. A mérőfej gradiens erősségének maximális értéke 350 mT/m (Doty Scientific Inc., Columbia, SC, USA). Hangolás, shim és kalibráció után a diffúzió súlyozott spin echo mérések 31 elemű különböző  $b$ -érték mellett történtek egyetlen szeletben. A  $b$ -értékek a következő tartományba estek: 0 – 17684 s/mm<sup>2</sup>. A mérés további paraméterei: repetíciós idő  $TR = 8000$  ms, echo idő  $TE = 28,2$  ms, FoV = 20 mm x 20 mm, szeletvastagság 3.0 mm, mátrix méret 16 x 16 pixel, gerjesztések száma 1. A szeletvastagság, a repetíciós idő nagy értékeit a nagyobb jel-zaj viszony elérése indokolja. Az egy irányba eső gradiens értékének limitáltsága miatt a három gradiens tekercs egyidejűleg lett kapcsolva. A diffúziósúlyozás paraméterei a következők voltak:  $\delta = 8,5$  ms,  $\Delta = 15,5$  ms. A gradiens maximális erőssége 300 mT/m. A centrifugált eritrociták esetén felléphet anizotrop elhelyezkedés. Ez elvileg anizotrop diffúziós tényezőhöz vezet \* (személyes kommunikáció P.W. Kuchel-lel). Próbamérésekkel igazolt módon az adott  $b$ -érték tartományban anizotrópiát nem sikerült kimutatni. A jelcsökkenés jellegének mono-exponenciástól való eltérése miatt biexponenciális illesztés történt Microcal Origin 6.0 szoftvercsomag segítségével. Mindkét exponens felhasználásra került a további vizsgálatokban. A spektroszkópiás mérőfejhez képest nagyobb gradiens erősség érhető el. Ennek tudható be, hogy a mono-exponenciális jelcsökkenéstől eltérés tapasztalható, és biexponenciális illesztés válik szükségessé.

## **Oldatok**

A proteolízis modell kísérleteihez különböző molekulák oldatai készültek. Az oldott molekulák mérete hatásának vizsgálatához modell polimer PEG (Polietilén-glikol: HO-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-H ) oldatok készültek. A PEG az etilén-oxid polimerje, széles molekulatömeg tartományban áll rendelkezésre kereskedelmileg. A PEG modellkísérletekben szélesan elterjedt körben használatos, vízzel tetszőleges arányban keveredik. Elágazás nélküli hosszú láncot alkotnak a monomerek. Oldószerként desztillált víz szolgált. Az oldott molekulatömegek 200, 600, 1000, 3350, 8000 és 15000 Da voltak. A PEG oldatok koncentrációja hatásának vizsgálatához 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20% és 25%-os (tömeg/térfogat) oldatok készültek. A biológiai polimerek vizsgálatához albumin és lizozim oldatok készültek, oldószerként izotóniás sóoldat szolgált. Az ionkoncentráció (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)

hatásának vizsgálatához különböző koncentrációjú sóoldatok készültek (referenciaminták). A lizált fehérjék hatásának vizsgálatához pepton oldatok készültek, amelyek széles tömegspektrumban tartalmaznak fehérjeszármazékokat. Oldószerként a fehérjeoldatokhoz hasonlóan izotóniás sóoldat szolgált. A pepton oldatok oldott molekulatömege hatásának vizsgálataihoz az oldatok a széles tömegspektrumú alap oldatból, mechanikus kaszkádszerű szűréssel készültek. Az oldatok koncentrációja a szűrt (most már meghatározott oldott molekulatömeg tartományú) mintákban száraz és nedves tömeg meghatározással és utólagos dialízissel, valamint izotóniás sóoldattal való visszahígítással történt. Az így előállított oldatokban a molekulatömegek  $< 3$  kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa, 10-30 kDa és  $30 \text{ kDa} <$  voltak. A koncentrációk az 5-35% (tömeg/térfogat) tartományba estek. A vegyi anyagok mindegyike a Sigma Aldrich-től származott (Sigma Aldrich Ltd. St. Louis, USA).

#### *Fluoreszcencia anizotrópia mérések – oldott molekulák mozgásának független mérése*

Az oldatokban lévő vízmolekulák mozgását MR diffúziós mérésekkel jól lehet követni. Az oldott molekulák és a vízmolekulák mozgása összefüggésben áll egymással, ennek az összefüggésnek a felderítése nem egyszerű feladat. Az oldott molekulák méretétől, alakjától és hidrofilitásától függ ez a kapcsolat. A relaxációs folyamatok a protein-víz interakciótól függ, a relaxációs helyek számától, illetve a víz e helyek közelében való tartózkodási idejétől. Az oldott molekulák diffúziós tényezője MR kísérletekkel csak akkor állapítható meg, ha az oldott molekulák nagy mennyiségben tartalmaznak karakterisztikus kémiai eltolódású hidrogénatomokat, amelyek MR jele spektrálisan elkülöníthető. Ez a PEG molekulák esetén lehetséges. A modellkísérletekben felhasznált albumin, lizozim és pepton esetén ez az eljárás nem alkalmazható. Az oldatok fluoreszcens jelölésével a marker molekulák diffúziója vizsgálható. A fluoreszcencia anizotrópia a molekulákhoz kapcsolódó marker rotációs diffúziójával van kapcsolatban, amely összefüggésbe hozható az oldatban jellemző translációs diffúziós folyamatokkal. Albumin és PEG oldatok fluoreszcens keverékével fluoreszcencia anizotrópia vizsgálatok készültek. Az oldatok FD4 (átlagos molekulatömeg 4 kDa) és FD40 (átlagos molekulatömeg 40 kDa) FITC-dextran jelölése történt. A felhasznált oldatok 1-8 kDa 10%-os PEG oldatok voltak, illetve 2,5% - 5% koncentrációjú albumin oldatok. Az oldatokon mért fluoreszcencia anizotrópia és ADC, illetve T2 relaxációs idő értékei kerültek összehasonlításra.

## VVT szuszpenzió

*Az „Intra és extracelluláris tér hatása az MR jelintenzitásban” kísérletekhez*

A vérminták fiatal egészséges alanyoktól származtak, a levétel után 10 IU Li-heparin tartalmú csövekbe kerültek. A vérminták jégen tartva 2 órán belül felhasználásra kerültek. A heparinnal kezelt vérmintákból a 3000 g érték mellett 10 percig való centrifugálás után (Sorvall RC-5 centrifuga (DuPont USA)) a plazma eltávolításra került. A vörösvértestek ezután három alkalommal átmosásra kerültek (pH 7,4 PBS: phosphate-buffered saline), 300 mOsm/kg ozmolaritás mellett.

Különböző inkubációs médium került felhasználásra az extracelluláris tér hatásának vizsgálatához. A PBS pufferhez albumin hozzáadásával 5%, 10% és 20% albumin koncentrációjú (tömeg/térfogat) oldatok készültek. Az így előálló inkubációs médium ozmolaritása 300 mOsm/kg volt. Ezzel azonos módon 10%-os lizozim inkubációs médium is készült az extracelluláris térben oldott anyag minősége hatásának vizsgálatához.

Az extracelluláris és intracelluláris térfogatarányok változtatása különböző erősségű centrifugálással érhető el. A VVT alap szuszpenzió centrifugálása után a felülúszó eltávolításával állítottuk elő a különböző térfogatarányú mintákat. A centrifugálás erőssége a következő volt: 120 g, 500 g, 1000 g, 3000 g, mindegyik 3 perces időtartammal (ez rendre 1000, 2000, 3000, 5000 fordulat per percnél felel meg). A centrifugálás után a mintákat gyenge vortexeléssel homogenizáltuk. A centrifugálás esetleges hatását kiküszöbölendő, minden mintához készült egy referencia EC minta. Ez a referenciaminta az azonos módon elkészített minta alapos centrifugálásával (30 perc, 20000 g) annak felülúszójának felhasználásával készült. A centrifugálás során ugyanis felmerült, hogy a VVT-khez kapcsolódó EC fehérjéket illetően koncentráció gradiens áll elő. Ugyanez a koncentráció gradiens felléphet egyéb, a VVT-k felszínéhez nem tapadó, de az alapos mosás ellenére a mintában maradó plazma fehérjék esetén is. A referencia minták és az inkubációs puffer diffúziós és relaxációs tényezői is mérésre kerültek.

A VVT szuszpenzió, mint szövetmodell intracelluláris tér hidratáltságának változtatása a következő módon történt. A VVT-k különböző ozmolaritású pufferben kerültek inkubálásra. A puffer oldatok 10% koncentrációban albumint tartalmaztak, ozmolaritásuk pedig 220 mOsm/kg és 330 mOsm/kg érték között változott. Az ozmotikusan manipulált VVT szuszpenziók a vonatkozó ozmolaritás mellett azonos módon készültek a többi mintával. Az extracelluláris tér ellenőrzése is a fentiekben leírt referencia minta elkészítésével történt.

Az extracelluláris térfogatfrakció meghatározása fluoreszcencia módszerrel történt. A fluoreszcens anyag FITC-dextrán volt (fluorescein isothiocyanate -dextran). A FITC-dextrán inert, a sejtmembránon áthatolni nem képes fluoreszcens komplex. Azonos (300 µl) térfogatú lecentrifugált VVT és FITC-dextran tartalmú (5 mg/ml koncentrációban, átlagosan 40 kDa molekuláris súlyú) PBS oldat alapos elkeverése után a szuszpenzió 30 percig 20000 g érték mellett centrifugálásra került. A felülúszóból származó 200 µl minta és egy FITC-dextrant tartalmazó, 5 mg/ml koncentrációjú referencia oldat fluoreszcenciáját hasonlítottuk össze. A fluoreszcencia mérések Hitachi F-4500 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) fluoreszcencia spektrométerrel készültek (gerjesztés: 490 nm, emisszió: 520 nm hullámhossz mellett). A FITC-dextran hígulása a centrifugált üledékbe az üledék extracelluláris frakciójától függ. Az extracelluláris térfogatfrakció meghatározása Thelwall és munkatársai által publikált, VVT ghost szuszpenziókra alkalmazott eljárását követte [43].

*Az „Intracelluláris crowding” kísérletekhez*

A humán vérminták levétele a fentiekben leírt módon történt. A tevé vérminták a Budapesti Állatkert közreműködésével kerültek levételre, és 24 órán belül felhasználásra kerültek. A VVT minta dehidrációja mannitol oldatban történt. A humán VVT-k 24 órán keresztül, 4 °C hőmérsékleten 10 mM Tris pufferben, izoozmotikus mannitol koncentráció mellett inkubálódtak. Mivel ez a pufferoldat nem tartalmaz  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  ionokat, az intracelluláris tér az inkubálás során ionokat veszít. Ez a dehidrációs módszer a hipertóniás oldatok alkalmazásához képest azzal az előnnyel jár, hogy így a  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  ionok sejtekbe való áramlása meggátolható, továbbá a mannitol nem képes a sejtmembránon áthatolni. Az inkubálás eredményeként a VVT-k gömb alakot vesznek fel. Az eljárás során ellenőrizhető, hogy a tevé eritrociták  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  ionkoncentrációja alacsonyabb a humán VVT-k-hez képest (165 mM, 128 mM-hoz képest). Az ozmotikus rezisztencia méréséhez, a minták a dehidrált sejtek különböző NaCl koncentrációjú oldatokkal való 30 perces inkubációjával készültek. A víztartalom meghatározása ezután száraz- és nedves tömeg meghatározásával történt. A VVT víztartalom az ozmotikus nyomás ( $\Pi$ ) inverzének függvényében lett ábrázolva. A mérési pontokra illesztett egyenes ordinátával való metszési pontja alapján határozható meg az ozmotikusan inaktív víztartalom [59]. A hemoglobin ozmotikus viselkedésének meghatározásához a minták a következő eljárással készültek. A hemoglobin az eritrociták hipotóniás hemolízisével kerültek izolálásra [60]. A ghost eltávolítása után egy éjszakán keresztül tartó liofilizálás után izotóniás, pufferezt NaCl hemoglobin oldat készült. Az így készült oldatok kolloid ozmotikus nyomásának mérése Knauer kolloid ozmométerrel történt (Knauer GmbH, Berlin, Germany). A koncentráció inverzének az ozmotikus nyomás inverze

szerinti ábrázolásában az illesztett egyenes ordinátával való metszéspontja határozza meg az ozmotikusan inaktív víztartalmat [59].

### ***Intracelluláris tér módosulásai***

A glükozamin kísérletekhez a sejtszuspenziók Jurkat sejteket tartalmaztak.

A Jurkat sejtek a következő sejtvonalból származtak: ATCC TIB 152 human acute T-cell leukemia. A sejtek tenyésztéséhez felhasznált médium: RPMI-1640 + 10% Fetal Bovine Serum + 100 U/ml penicillin és 100 µg/mL streptomycin. A kísérlet előtt a médium lecserélésre került friss, meleg médiummal, ami 5 mM glükózt tartalmazott.

Négy különböző módon kezelt sejtszuspenzió készült, mindegyik  $\sim 2,5 \times 10^7$  sejt/minta sejttartalommal, a kezelés 37 °C-on 1 órás inkubálással történt.

1. kontroll minta:  
további 5 mM glükóz hozzáadásával (összesen 10 mM glükóz)
2. glükozaminnal kezelt sejtek  
5 mM glükozamin hozzáadása
3. PUGNAc kezelt minta  
5 mM PUGNAc hozzáadása
4. glükózzal kezelt sejtek  
25mM glükóz hozzáadása (összesen 30 mM glükóz)

Az inkubáció után a minták gyors lecentrifugálás után 500 µl 10%-os BSA tartalmú Hank's médiumban lettek mosva. Újabb centrifugálás és a felülúszó gondos eltávolítása után 50%-os (térfogat/térfogat) módosított Hank's médiumos szuszpenzió készült. Ez a médium a továbbiakat tartalmazta: 10% BSA, 5 mM glükóz, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgSO<sub>4</sub> és a pH érték: pH = 7,2. Az albumin hozzáadása a sejtek ülepedését gátolja (eljárás: dr. Nagy Tamás).

A sejtszinkronizációs eljáráshez HeLa sejtvonal került felhasználásra. A tenyésztés hasonló körülmények között történt, RPMI-1640 helyett DMEM felhasználásával. A kísérlet előtt a HeLa sejtek tripszin felhasználásával kerültek a médiumba. Ezután a következő inkubációs lépések történtek:

1. centrifugálás után reszuszendálás PBS-ben, timidin hozzáadásával, amelynek végső koncentrációja a médiumban 2 mM
2. 37 °C –on 19 óráig inkubálás
3. médium eltávolítás és háromszor PBS-ben mosás
4. friss, timidin nélküli médiumban reszuszenzió, inkubálás 9 órán át 37 °C –on.



## 5. timidin hozzáadása 2 mM koncentrációig, inkubálás újabb 16 órán át

A timidinnel való kezelés hatására a sejtek G1 fázisba kerülnek (eljárás: dr. Sáfrány Géza).

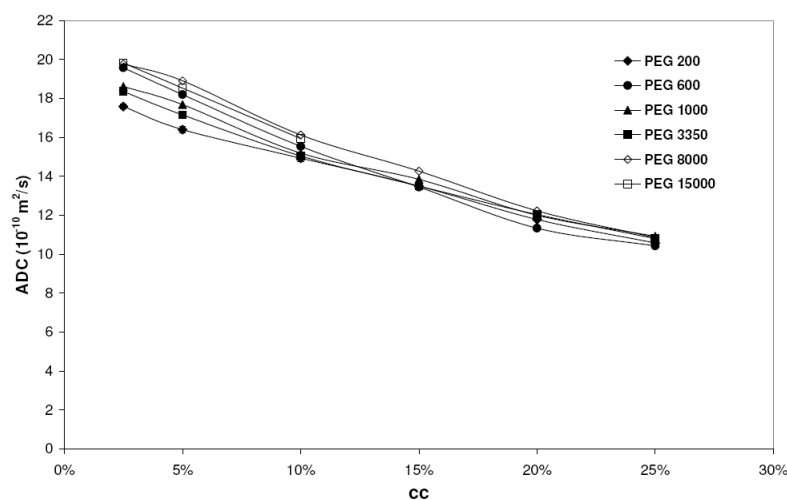
Az inkubálás és újbóli centrifugálás után a reszuszenzió a tenyésztésnél használt médiummal történt. A sejtek ülepedését itt 0,3%-os agar hozzáadásával gátoltuk, amely 42 °C felett nem dermed, a reszuszenzió és kapillárisba való felszívást követően szobahőmérsékleten a dermedés másodpercek alatt megtörténik. Ülepedés ez után nem volt tapasztalható, az egy mintán belüli, egymás után mért ADC értékek időben (1-órán belül) nem változtak.

# Eredmények

## Proteolízis modell

PEG, albumin, lizozim és pepton, különböző koncentrációjú vizes oldatait állítottuk elő. Az oldatok diffúziós tényezője és T2 transzverzális relaxációs ideje került meghatározásra, MR spektroszkópiai eljárással. Az oldott molekulák diffúziójának és relaxációjának, az oldott molekulák minőségétől, molekulatömegétől és koncentrációjától való függése került meghatározásra. Továbbá, albumin oldatban FITC-dextran hozzáadásával a fluoreszcencia anizotrópia vizsgálatok történtek, amelyek az azonos oldatokban MR módszerrel mért diffúziós tényezőjével kerültek összehasonlításra. PEG oldatokban a PEG molekulák diffúziója MR módszerrel mérhető, a víz diffúziójával egy időben, azonos mintán. Az azonos oldatokban mért víz és PEG molekulák diffúziója összehasonlításra került.

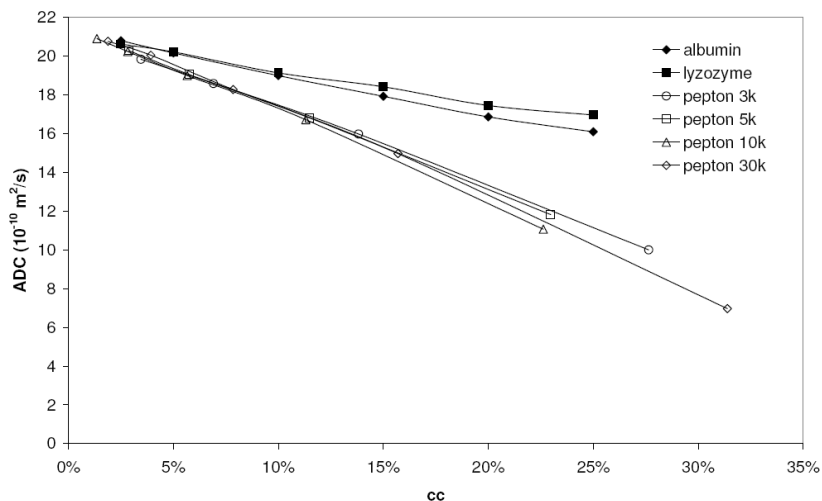
A PEG vizes oldataival végzett mérések az oldott PEG molekulák koncentrációjának növekedésével a víz diffúziós tényezőjének csökkenését mutatták.



18. ábra – A PEG vizes oldatában a víz diffúziós tényezője a PEG koncentrációjának függvényében

A 18. ábra jól szemlélteti, hogy a koncentrációfüggés a PEG molekulák esetén lineárishoz közeli. Adott molekulatömegű mérési pontok esetén a lineáris illesztés jósága  $R^2 > 0,98$ . A molekulák méretétől való függés minimális. Az abszolút értékek közötti legnagyobb eltérés a 10%-25% koncentráció tartományban kisebb mint 6%, a mérési pontok exponenciális illesztés pontatlanságából adódó hibája  $< 0,6\%$ .

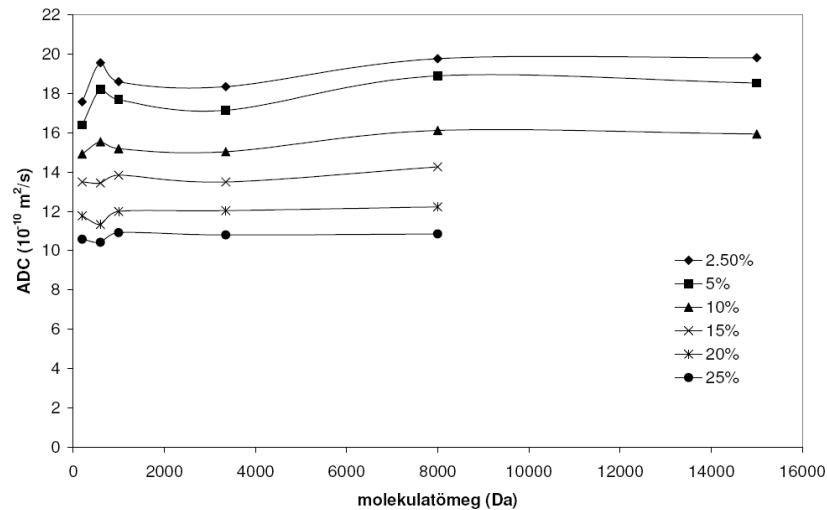
Ugyanez a lineáris koncentrációfüggés tapasztalható albumin, lizozim és pepton oldatai esetén is (ld. 19. ábra).



**19. ábra – peptidek vizes oldatában a víz diffúziós tényezője a peptid koncentrációjának függvényében**

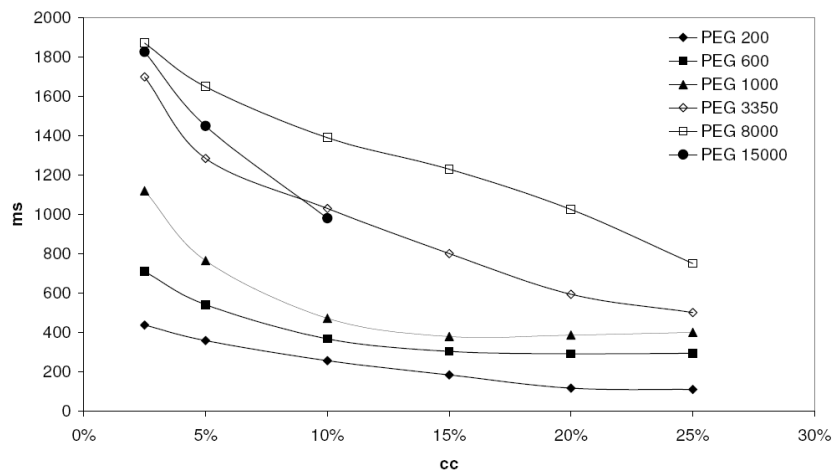
A peptidek vizes oldatában a lineáris illesztés jósága  $R^2 > 0,99$ .

Az oldott molekulák mérete és minősége, valamint koncentrációja egyaránt befolyásolja az oldószer (víz) diffúziós tényezőjét. A koncentráció széles tartományban jó közelítéssel lineáris összefüggésben áll a víz diffúziójával. A koncentrációtól való függés és a molekulatömegtől való függés számszerű összehasonlítása nem ad érdemi információt. A 0%-25% koncentráció-tartományban (amely az élettani szempontból releváns koncentráció-tartományt lefedi) a diffúziós tényező 50%-os változást szenvedhet. Ugyanakkor a 200 Da – 30 kDa molekulatömeg tartományban a diffúziós tényező 6%-7% -os változásával lehet számítani. A diffúziós tényező, mint az oldott molekulák minőségének e tartományokra értelmezett indikátora, a koncentrációra érzékeny indikátornak tekinthető, a molekulatömegre ezzel szemben nem tekinthető érzékenynek. A 20. ábra szemlélteti a diffúzió, mint a molekulatömeg indikátorának alacsony érzékenységet.



**20. ábra – PEG oldatban a víz diffúziós tényezőjének függése a molekulatölemtől, különböző koncentrációk esetén**

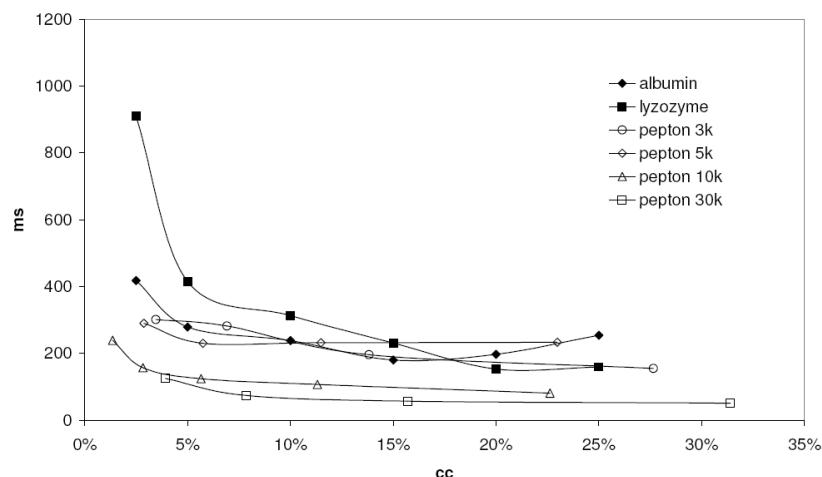
A T2 transzverzális relaxációs idő a diffúziós tényezőtől eltérő viselkedést mutat. A 21. ábra a víz T2 relaxációs idő koncentrációfüggését ábrázolja PEG oldatokban. A T2 relaxációs idő koncentrációtól való függése a lineáristól eltérő viselkedést mutat. A molekulatömeg jelentős hatással van a relaxációs időre, a görbék lefutása jelentősen különbözik egymástól.



**21. ábra**

Az 200 Da -1000 Da molekulatömegű oldatok esetén a koncentrációfüggés megszűnik (mérési hibán belül) a 10%-25% koncentrációtartományban.

A 22. ábra a T2 relaxációs idő koncentrációfüggését ábrázolja peptid oldatok esetén.

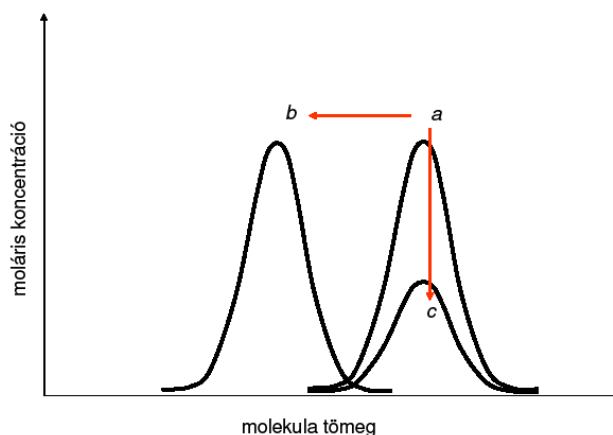


22. ábra

A peptid oldatok esetén a koncentrációtól való gyenge függés még inkább feltűnő. A pepton oldatok esetén az 10%-25% koncentrációtartományban a T2 relaxációs idő változása átlagosan 6%, a mérési hiba ebben a tartományban < 7%.

Érdeemes összehasonlítani a diffúziós tényező és a transzverzális relaxáció idő függését az említett mérési tartományokban.

Általános kvantitatív összefüggés a koncentráció, molekulatömeg, valamint a diffúziós tényező és transzverzális relaxációs idő között a mérési eredmények alapján, az oldott molekulák minőségétől függetlenül nem állítható fel. A különböző minőségű oldott molekulákkal végzett kísérletek jól illusztrálják, hogy a diffúziós tényező és a T2 relaxációs idő változásai nem korrelálnak egymással, merőben különböző koncentráció-, és molekulatömeg-függést mutatnak. A kísérlet mérési tartományában a diffúziós tényező a koncentráció változásának, a T2 relaxációs idő a molekulatömeg változása indikátorának tekinthető.

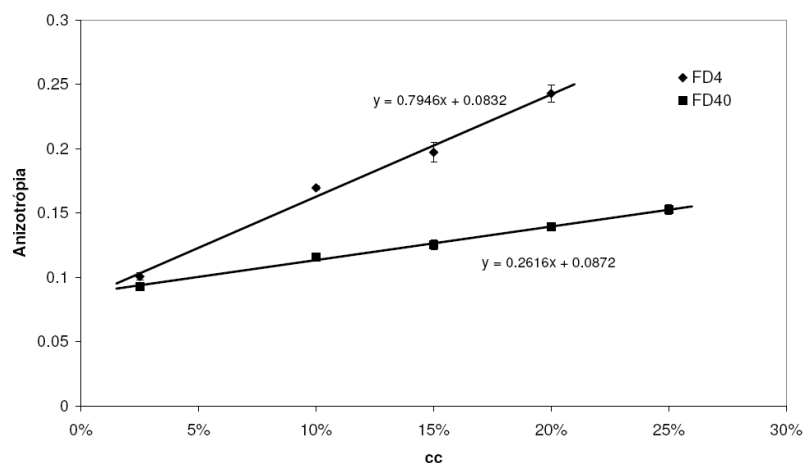


**23. ábra**

A peptonoldatok méréseiből a következő kvalitatív következtetések vonhatók le (ld.: 12. ábra). A kísérletek a 23. ábrán illusztrált változásokat modellezzik. Az  $a \rightarrow b$  folyamat az oldott anyagok spektrumában olyan változást jelent, ahol az oldott anyag koncentrációja nem változik (23. ábrán az eloszlás görbe alatti terület), ugyanakkor az oldott anyagok átlagos molekulatömege változik. A  $a \rightarrow c$  folyamat során a görbe alatti terület változik (koncentráció csökkenés), az átlagos molekulatömeg változatlan. Az  $a \rightarrow b$  folyamat során a diffúziós tényező (pepton esetében) a mérési tartományban  $< 10\%$  csökkenést mutat, míg a T2 relaxációs idő 3,8-szeresére változik. Az  $a \rightarrow c$  folyamat során a diffúziós tényező a mérési tartományban 50%-os csökkenést mutat, míg a T2 relaxációs idő, mérési hibán belül változatlan.

A mérési eredmények rávilágítanak továbbá arra is, hogy a T2 relaxációs idő meghatározásához nem elégséges az oldott molekulák tömegét és koncentrációját figyelembe venni. A PEG és a pepton oldatokban a molekulatömeg növekedésével a T2 relaxációs idő ellentétes irányban változik.

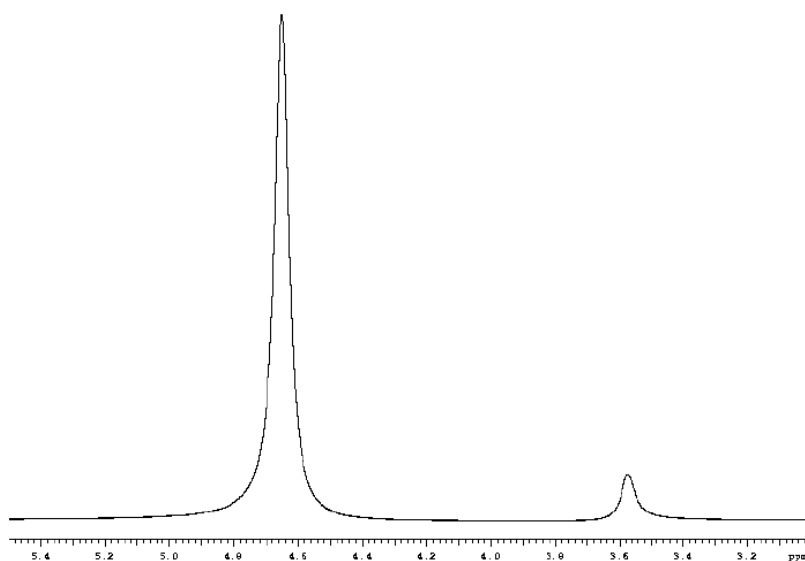
Az oldatok diffúziós viselkedését fluoreszcencia vizsgálatok egészítik ki. A fluoreszcens molekulák rotációs diffúziója határozza meg a mért fluoreszcencia anizotrópia mértékét. A 24. ábra a különböző koncentrációjú albumin oldatokban mért fluoreszcencia anizotrópia értékét ábrázolja az oldatban MR spektroszkópiával mért diffúziós tényező függvényében.



**24. ábra**

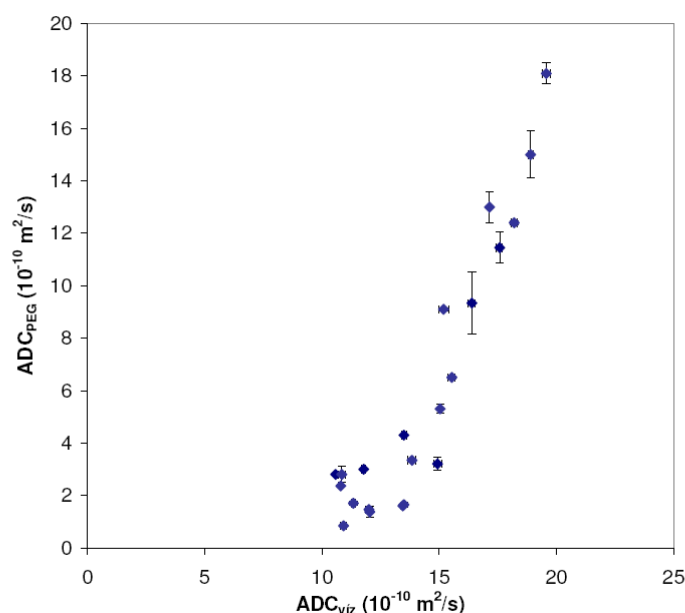
A FITC-dextran molekulák rotációs diffúziója és az oldatban mért diffúziós tényező pontos ( $R^2 > 0,99$ ) lineáris összefüggést mutat.

A PEG oldatok esetében lehetséges a PEG molekulák diffúziójának közvetlen MR diffúziós kísérlettel való mérése. Ezt a PEG MR jelének határozott kémiai eltolódása teszi lehetővé. A 25. ábra a PEG vizes oldatának MR spektrumát mutatja.



**25. ábra – PEG vizes oldatának MR spektruma**

A víz és PEG molekulák diffúziójának egyidejű mérése alapján összevethető a molekulák diffúziós tényezője. A 26. ábrán különböző (koncentráció ill. PEG molekulatömeg) PEG oldatokból származó oldott molekula diffúziós tényezőjét ábrázolja az oldószer (víz) molekulák diffúziós tényezője függvényében.



26. ábra

Megfigyelhető, hogy alacsony víz diffúziós értékek felé haladva (magasabb PEG koncentráció), a PEG molekulák diffúziós tényezője kisebb mértékben csökken a víz molekulák diffúziós tényezőjéhez képest (lineáris összefüggéstől való eltérés). Ez a PEG molekulák alakjával áll kapcsolatban. A magas PEG koncentráció a hosszú polimerláncok kölcsönhatásához vezet (összegabalyodás - entanglement). A polimer oldatokban ebben a koncentrációtartományban a polimerek korlátozott diffúziója valósul meg, pl.: reptáció [61].

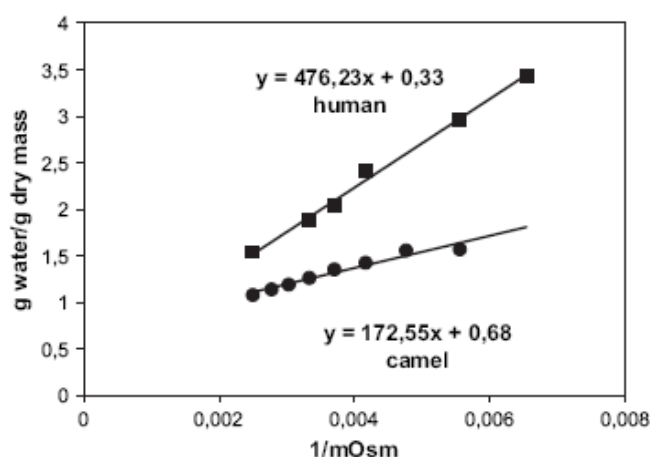
A PEG molekulák diffúziójára vonatkozó kísérleti eredmények következményeként a következő megállapítások tehetők. Az MR diffúziós mérések során a mért jelről nem feltétlenül mondható el, hogy ebben a nem a vízből származó hányad elhanyagolható (a PEG oldatok spektrumában ez szembetűnő, ld.: 25. ábra). Kémiai eltolódás hiánya esetén az oldott anyagokból származó jel nagysága nem becsülhető meg. Az MR diffúziós mérések tehát az összes hidrogén jel átlagát tartalmazzák. Az oldott molekulák diffúziója a koncentráció növekedésével nem mindig áll lineáris összefüggésben. Ebből következően, az MR diffúziós mérésekből származó diffúziós tényező az oldott molekulák közötti kölcsönhatástól is függ. Ez nagyobb koncentrációk esetén egyre erősebben jelentkezik. Ugyanakkor elmondható az is, hogy amennyiben az oldott molekulákból származó jel nem elhanyagolható (oldott molekulák és víz hidrogéntartalmának aránya), valamint az oldott molekulák translációs diffúziója



határozott eltérést mutat a vízmolekulákhoz képest, akkor a mért MR jel  $b$ -érték függése megjósolhatóan nem mono-exponenciális.

### ***Ozmotikus rezisztencia – diffúzió***

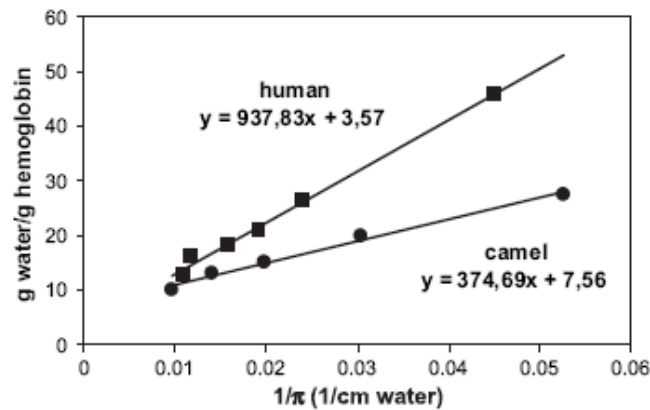
Humán és teve VVT-k különböző NaCl tartalmú oldatokban való reszuszenziója és 30 perces inkubálása után a minta víztartalma és száraz tömege meghatározásra került. A 27. ábra mutatja az intakt humán és teve eritrociták ozmotikus reakcióját.



**27. ábra – Az abszcissa a minta ozmotikus nyomásának reciprokát ábrázolja 1/mOsm egységekben, az ordináta a minta víztartalmának és szárazanyagtartalmának grammokban kifejezett arányát (dimenzió nélküli mennyiség) [54]**

Az ábrán a mérési pontokra illesztett egyenes ordinátával való metszéspontjából határozható meg az ozmotikusan inaktív víztartalom. A humán eritrociták esetén az illesztett egyenes meredeksége sokkal nagyobb. A teve eritrociták ozmotikusan inaktív víztartalma magasabb, mint a humán eritrocitáké.

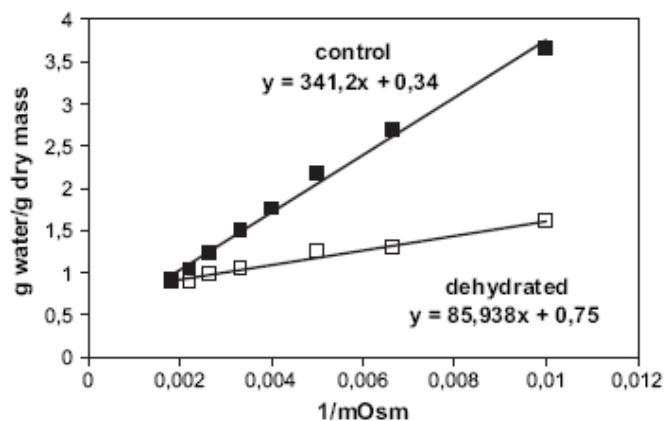
Az oldószer (víz) tulajdonságait az eritrociták hemoglobintartalma befolyásolja. A hemoglobin hatásának közvetlen vizsgálatához, különböző koncentrációjú (2%-10%, tömeg/térfogat) teve és humán hemoglobin oldatok kolloid ozmotikus nyomásának mérése történt. A 28. ábra ábrázolja a mérési eredményeket.



28. ábra - Az abszcissza az oldat kolloid ozmotikus nyomásának reciprokát ábrázolja 1/cm egységekben, az ordináta a minta víztartalmának és szárazanyagtartalmának grammal kifejezett arányát (dimenzió nélküli mennyiség) [54]

Az ozmotikusan inaktív víztartalom a teve hemoglobin oldat esetében szignifikánsan magasabb értéket mutat, humánban: 3,57 g víz/g hemoglobin, tevében: 7,56 g víz/g hemoglobin. Ez a viszony az eritrociták esetén is igaz.

A humán eritrociták víztartalma ( $2,08 \pm 0,07$ ) g (víz)/g (szárazanyag). Ez a teve eritrociták víztartalmának duplája \*(ld.: 1. táblázat). Az eritrociták dehidráálásával az ozmotikus rezisztanciájuk megváltozik. Mannitol inkubációval dehidrált humán eritrociták ozmotikus válaszát ábrázolja a 29. ábra.



29. ábra [54]

A dehidrált eritrociták ozmotikusan inaktív víztartalma a kontrollhoz képest jelentősen nagyobb, a teve eritrocitákhoz közeli értéket vesz fel.

	g víz/g száraz tömeg	$ADC_{fast}$ $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$ADC_{slow}$ $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$f_{slow} \%$
Normális humán eritrocita	$2,08 \pm 0,07$	$3,52 \pm 0,20$	$0,72 \pm 0,06$	$36 \pm 2$
Dehidrált humán eritrocita	$1,11 \pm 0,14$	$3,04 \pm 0,25$	$0,58 \pm 0,16$	$28 \pm 8$
Normális teve eritrocita	$1,02 \pm 0,10$	$2,90 \pm 0,09$	$0,62 \pm 0,06$	$34 \pm 6$

**2. Táblázat [54]**

A teve, humán és a mannitollal dehidrált humán eritrociták víztartalmát, és diffúziós tényezőit tartalmazza az 2. táblázat. A  $b$ -érték függvényében való jelcsökkenés bi-exponenciális illesztésének eredményeként a diffúziós tényező gyors és lassú tagokra bontható:  $ADC_{fast}$ ,  $ADC_{slow}$ . Az extracelluláris tér hiánya miatt a 6. ábrán illusztrált módusok nagyobb szerepet kapnak, ezért a monoexponenciálisról eltérő jelcsökkenés tapasztalható. A módusok a geometriai korlátok miatt alakulnak ki, fizikai kompartmentek nem játszanak szerepet. Ez a kísérleti eredmény megerősíti azokat az in-vivo eredményeket, amelyek szerint nem monoexponenciális jelcsökkenés kompartmentektől függetlenül is felmerülhet [76]. Ezért a módusok külön-külön egyaránt tükrözik az intracelluláris tér diffúziójának változását. A lassú komponens százalékos arányát jellemzi az  $f_{slow}$  paraméter. A diffúziós értékek a víztartalom változásával jól korrelálnak. Az eritrociták víztartalmának különbsége humán és teve esetben közel kétszeres, míg a diffúziós értékek csak 15%-18% különbséget mutatnak. 20% koncentrációjú hemoglobin oldatok összehasonlításában kitűnik, hogy a jelentős hidrofilitásbeli, illetve ozmotikusan inaktív víztartalomban meglévő különbségek ellenére a diffúziós tényezők közel azonos értéket vesznek fel. Teve hemoglobin oldat esetében ez az érték  $1,23 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ , humán esetében pedig  $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ .

Az eritrocitákkal végzett kísérletek összhangban vannak a hemoglobin oldatokon végzett kísérletekkel. Az eritrocita minták gyakorlatilag extracelluláris tértől mentesek, a sejten belüli proteintartalom 95%-át a hemoglobin teszi ki. Az eritrocitaminták gyakorlatilag hemoglobin oldatokként viselkednek azzal a különbséggel, hogy a diffúziót limitáló véges permeabilitású sejtmembránok vannak jelen.

A teve és humán eritrocitákon végzett kísérletek összhangban vannak a PEG, pepton oldatokon végzett diffúziós kísérletekkel. A különböző hemoglobin oldatok azonos koncentráció mellett azonos diffúziós tulajdonsággal bírnak, a hemoglobinkoncentráció csökkenése pedig a víz diffúziójának csökkenéséhez vezet.

## IC és EC tér független vizsgálata – VVT szuszpenzió

Az extracelluláris és intracelluláris tér hatásának vizsgálatához VVT szuszpenziók szolgáltak modell-rendszerként. Az extracelluláris tér ADC-re és T2 relaxációs időre vonatkozó hatása vizsgálatához különböző minőségű (albumin, lizozim oldatok) és koncentrációjú oldatokban szuszpendált VVT mintákat használtunk. Az intracelluláris tér hatása vizsgálatához az extracelluláris térként szolgáló médium különböző NaCl koncentrációval készült oldataiban szuszpendált VVT-k szolgáltak.

Az effektív médium elméleti modell a következő paraméterek között teremt kapcsolatot: EC és IC tér diffúziója, a sejtméret és sejtmembrán permeabilitása, az EC tér térfogatfrakciója, valamint a közegben mérhető ADC, azaz effektív diffúziós tényező ( $D$ ). A (15) egyenlet:

$$\frac{Dc_{\text{eff}} - D_1c_{\text{IC}}}{D_{\text{EC}}c_{\text{EC}} - D_1c_{\text{IC}}} \cdot \left( \frac{D_{\text{EC}}c_{\text{EC}}}{Dc_{\text{eff}}} \right)^{1/3} = \varphi, \quad (15)$$

ahol:  $D_1c_{\text{IC}} = \frac{Dc_{\text{eff}} - \kappa a D_{\text{IC}}c_{\text{IC}}}{\kappa a + D_{\text{IC}}c_{\text{IC}}}$ , és  $c_{\text{eff}} = \varphi \cdot c_{\text{EC}} + (1 - \varphi) \cdot c_{\text{IC}}$ .

A fenti kifejezésben a paraméterek abszolút értékei szerepelnek, célszerűbb azonban áttérni relatív értékekre. A (15) egyenletből:

$$\frac{\frac{D}{D_{\text{EC}}} \frac{c_{\text{eff}}}{c_{\text{EC}}} - \frac{D_1}{D_{\text{EC}}} \frac{c_{\text{IC}}}{c_{\text{EC}}}}{1 - \frac{D_1}{D_{\text{EC}}} \frac{c_{\text{IC}}}{c_{\text{EC}}}} \cdot \left( \frac{D_1}{D_{\text{EC}}} \frac{c_{\text{IC}}}{c_{\text{EC}}} \right)^{-1/3} = \varphi, \quad (33)$$

ahol a következő két tényező további kifejtésével:

$$\frac{D}{D_{\text{EC}}} \frac{c_{\text{eff}}}{c_{\text{EC}}} = \frac{D}{D_{\text{EC}}} \left[ \varphi + (1 - \varphi) \frac{c_{\text{IC}}}{c_{\text{EC}}} \right], \quad (34-1)$$

illetve:

$$\frac{D_1}{D_{\text{EC}}} \frac{c_{\text{IC}}}{c_{\text{EC}}} = \frac{D_{\text{IC}}}{D_{\text{EC}}} \frac{c_{\text{IC}}}{c_{\text{EC}}} \frac{1}{1 + \frac{D_{\text{IC}}c_{\text{IC}}}{\kappa a}}. \quad (34-2)$$

A  $\kappa a$ ,  $c_{\text{IC}}$  és  $D_{\text{IC}}$  paraméterek a (33) kifejezést nehezen kezelhetővé teszik (ld. 34-2. jobb oldala). A (25) kifejezésből következik, hogy  $\varphi \rightarrow 0$  esetben (EC tértől mentes, alaposan centrifugált VVT üledék) (26-1) és (26-2) bal oldala meg kell, hogy egyezzen. Így (34-2) jobb

oldala helyettesíthető a következővel tényezővel:  $\frac{D(\varphi=0)}{D_{\text{EC}}} \frac{c_{\text{eff}}}{c_{\text{EC}}}$ . Ezzel a (33) kifejezés a

következő alakra hozható:

$$\frac{\frac{D(\varphi)}{D_{EC}} \left[ \varphi + (1-\varphi) \frac{c_{IC}}{c_{EC}} \right] - \frac{D(\varphi=0)}{D_{EC}} \left[ \varphi + (1-\varphi) \frac{c_{IC}}{c_{EC}} \right]}{\frac{D(\varphi=0)}{D_{EC}} \left[ \varphi + (1-\varphi) \frac{c_{IC}}{c_{EC}} \right]} \cdot \left( \frac{D(\varphi)}{D_{EC}} \left[ \varphi + (1-\varphi) \frac{c_{IC}}{c_{EC}} \right] \right)^{-1/3} = \varphi . \quad (35)$$

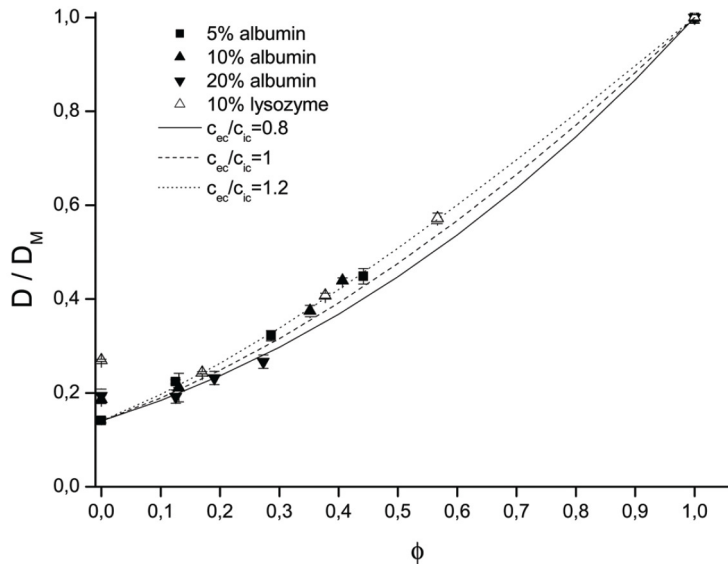
Elmondható tehát, hogy a következő paraméterek között az alábbi összefüggés áll fenn:

$$\Phi \left[ \frac{D(\varphi)}{D_{EC}}, \frac{D(\varphi=0)}{D_{EC}}, \frac{c_{IC}}{c_{EC}}, \varphi \right] = 0, \quad (36)$$

ahol  $\Phi$ , változóinak harmadrangú függvénye. (35) és (36) kifejezésben minden paraméter egyszerűen mérhető a VVT szuszpenzióval végzett kísérletekben. A kísérleti eredményekre (36) kifejezésnek megfelelően elméleti görbe illeszthető a legkisebb négyzetes eltérés módszerével, ahol  $c_{IC}/c_{EC}$  az illesztés paramétere. Érdemes itt megjegyezni, hogy a (36) kifejezésben  $\Phi$  változói egymástól nem függetlenek.

Az EC tér hatásának vizsgálatánál különböző EC térfogat-frakciójú ( $\varphi$ ) minták készültek, a szuszpenziók különböző mértékű centrifugálásával. A felülúszó és a szuszpenziós médium ADC (az EMT kifejezésekben:  $D_{ec}$ ) és T2 mért értékei a mérés hibáján belül megegyeztek. Ez a kísérleti eredmény arra mutat rá, hogy a centrifugálás hatása sem az EC tér oldott molekuláit<sup>7</sup>, sem a VVT-k intaktságát<sup>8</sup> nem befolyásolta olyan módon, hogy az kihatással lett volna az MR mérések eredményeire.

A 30. ábra a relatív ADC ( $D/D_{ec}$ ) értékeit ábrázolja, a  $\varphi$  függvényében.



30. ábra [78]

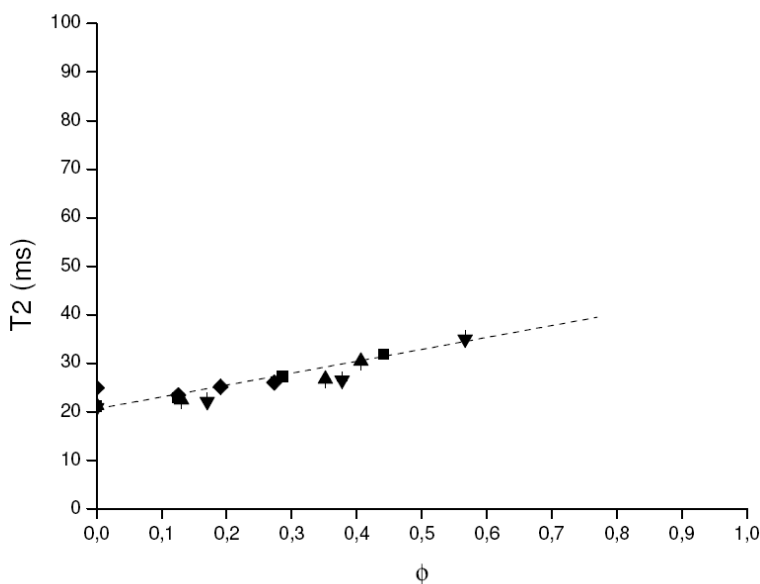
<sup>7</sup> Oldott EC molekulák VVT membránhoz tapadása, centrifugálás során való ülepedés

<sup>8</sup> Hemolízis, IC tartalom kiáramlása az EC térbe

A 30. ábra jól illusztrálja, hogy az EC térben oldott proteinek molekulatömege és hidrofilitása nincs hatással a relatív ADC értékre. Az ábrán feltüntetett görbék az effektív médium modellből (EMT) származó elméleti görbék különböző vízkoncentrációk mellett ( $c_{ec}/c_{ic}$ ). Az elméleti görbék a kísérleti eredményekkel igen jó egyezést mutatnak. A görbék menete arról tanúskodik (pozitív második derivált), hogy az extracelluláris térfogatfrakciótól való függés az alacsony  $\phi$  értékek felé haladva csökken. Az abszolút ADC érték EC tér koncentrációjától való függése az oldatkísérletekben meghatározott módon írható le (ld. 19. ábra).

A 30. ábrán az elméleti görbék különböző  $c_{ic}/c_{ec}$  paramétereket jelölnek. Látható, hogy a  $c_{ic}/c_{ec}$  paraméter széles tartományban jó egyezést ad a kísérleti eredményekkel, továbbá szembetűnő, hogy a paraméter változására a relatív diffúziós tényező nem érzékeny.

A 31. ábra a T2 relaxációs idő  $\phi$  függését ábrázolja.



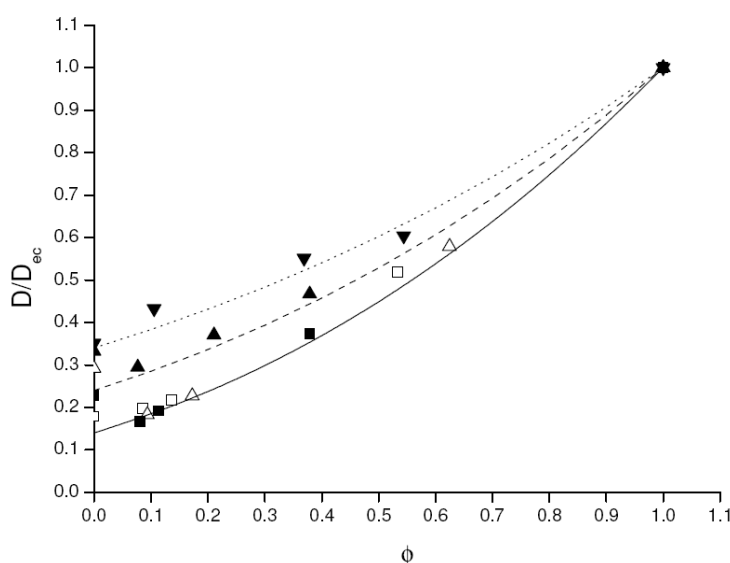
**31. ábra - T2 relaxációs idő ábrázolva  $\phi$  függvényében. A szimbólumok különböző mintákon mért értékeket reprezentálnak, amelyek az EC térben oldott proteinekben különböznek: 5% albumin (■), 10% albumin (▲), 20% albumin (▼), 10% lizozim (◆). A szaggatott vonal az összes mért adatra való lineáris illesztés eredménye [78].**

Sem az EC térben oldott molekulák minősége, sem azok koncentrációja nem befolyásolta a mért tartományban, adott  $\phi$  mellett a T2 értékeket.

A diffúziós tényező és a T2 relaxációs idő viselkedését összehasonlítva elmondható, hogy a relatív diffúziós tényező ( $D/D_{EC}$ ), a relatív T2 relaxációs idő  $\left( \frac{1}{T2} \frac{dT2}{d\phi} \right)$  változásához képest annak kb. negyede az adott  $\phi$  mérési tartományban.

Az IC tér hatásának vizsgálatához 200-500 mOsm ozmolaritású, 10% albumint tartalmazó EC médium készült. A  $\phi$  változtatása a fentiekkel azonos módon történt. A centrifugálás káros mellékhatásai e kísérletekben sem jelentkeztek.

A 32. ábra az ozmotikus kísérletekben mért relatív diffúziós tényezőt ábrázolja az EC tér térfogatfrakciójának függvényében ( $\phi$ ).



**32. ábra - A relatív effektív diffúziós tényező ( $D/D_{ec}$ )  $\phi$  függvényében. A vonalak az EMT-ből származtatott elméleti görbék a következő paraméterekkel:  $c_{ec}/c_{ic} = 0.8$ , folytonos vonal  $(D/D_{ec})_{\phi=0} = 0.14$ ; szaggatott vonal  $(D/D_{ec})_{\phi=0} = 0.24$ ; pontozott vonal  $(D/D_{ec})_{\phi=0} = 0.34$ . A szimbólumok a következő ozmolaritású szuszpenziókat jelölik: 220 mOsm ( $\square$ ), 260 mOsm ( $\triangle$ ), 300 mOsm ( $\blacksquare$ ), 400 mOsm ( $\blacktriangle$ ) and 500 mOsm ( $\blacktriangledown$ ).**

A 32. ábra elméleti görbéinek menete a  $c_{ic}/c_{ec}$  paramétertől szintén gyakorlatilag függetlenek (a különböző paraméterek választása az illeszkedés jószágát alig befolyásolja). Ez nem azt jelenti, hogy az intracelluláris víztartalom nem befolyásolja a szuszpenzióban mért diffúziós tényező értékét.  $(D/D_{ec})_{\phi=0}$  ugyanis implicit módon tartalmazza az intracelluláris tér koncentrációját (ld.: 34-1 és 34-2 kifejezések). Az intracelluláris tér hatása 32. ábrán az elméleti görbék ordinátáival való metszéspontjának ( $(D/D_{ec})_{\phi=0}$ ) eltolódásában érhető tetten.

A (27) és (28) kifejezések ugyan könnyen kezelhetők, ugyanakkor változói nem függetlenek egymástól.

32. ábrán megfigyelhető, hogy a normál (300 mOsm) ozmolaritásnál alacsonyabb ozmolaritású médiummal készült szuszpenziók diffúziós tényezői nem mutatnak eltérést. A hiperozmotikus szuszpenziók esetében határozott változás figyelhető meg. Az EMT modell e viselkedésre elfogadható magyarázatot nyújt. (15) kifejezés  $c_{EC} = 0$  esetén a következő egyszerű alakot veszi fel:

$$\frac{1}{D(\varphi)} = \frac{1}{D_{IC}} + \frac{c_{IC}}{\kappa \cdot a} . \quad (37)$$

Az oldatkísérletek alapján feltételezhető, hogy  $D_{IC}$  és  $c_{IC}$  között lineáris összefüggés áll fenn:

$D_{IC} = m \cdot D_0 \frac{c_{IC}}{c_0}$ , ahol  $c_0$  az izoozmotikus sejtek koncentrációja,  $D_0$  pedig az intracelluláris

diffúziója. Amennyiben feltételezhető, hogy az EC tér ozmolaritása csak a sejtek méretének változásával jár, úgy a sejtméret ( $a$ ) és az intracelluláris vízkoncentráció között a következő

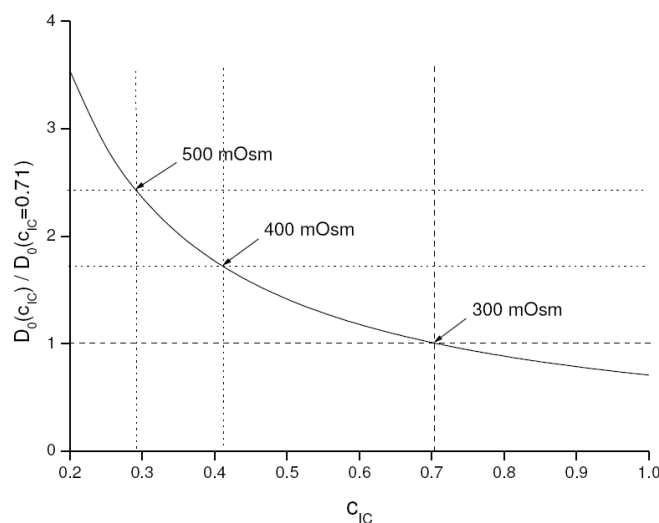
összefüggés teremthető:  $(a = a_0 \left( \frac{1-c_0}{1-c_{ic}} \right)^{1/3})$ , ahol  $a_0$  az izoozmotikus sejtek mérete). Így a

$\varphi=0$  esetben, az effektív diffúziós tényezőre a következő összefüggés érvényes:

$$\frac{D_0}{D} = m \cdot \frac{c_{IC}}{c_0} + \frac{D_0}{\kappa \cdot a_0} \cdot c_{IC} \left( \frac{1-c_0}{1-c_{IC}} \right)^{1/3} . \quad (38)$$

A 33. ábra  $D_0(c_{IC})/D_0(c_{IC}=0,71)$  elméleti értékét ábrázolja  $c_{IC}$  függvényében, a következő feltételezések mellett:  $\kappa = 0,01$  cm/s,  $a_0 = 2 \cdot 10^{-4}$  cm és  $m \approx 1$ .

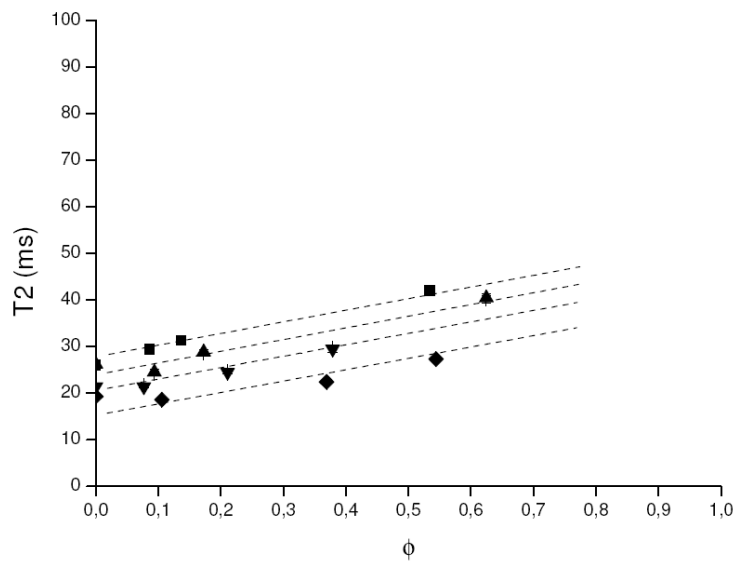




**33. ábra – Az elméleti görbe a (30) kifejezés alapján, a sejtek zsugorodásával , illetve duzzadásával járó hatását szemlélteti. A relatív, teljesen centrifugált minta diffúziós tényezőjét ábrázolja:  $(D_e / D_{ec})_{\varphi=0}$  . A  $(D_e / D_{ec})_{\varphi=0}$  becsült értékek nyíllal jelölve 300, 400 és 500 mOsm mellett. ( $c_{ic}$  izoozmotikus értékének becslése ld.: [36])**

A 33. ábra jól szemlélteti, hogy a hipoozmotikus, sejtduzzadással járó esetben az izoozmotikus értékektől való eltérés kisebb, mint a hiperozmotikus esetekben (ld.: 33. ábra, pozitív második derivált). Ez az elméleti eredmény egybevág az irodalmi adatokkal [72]. Ez nyilvánvalóan csak egy durva becslés, hiszen nem veszi figyelembe a sejtek alakjának változását. Fontos megjegyezni, hogy hasonló viselkedést figyelt meg Kuchel [36], amelyet a sejtek felületének relaxációs hatásával indokolt. A két effektus egymást nem zárja ki, és egymás hatását erősíti.

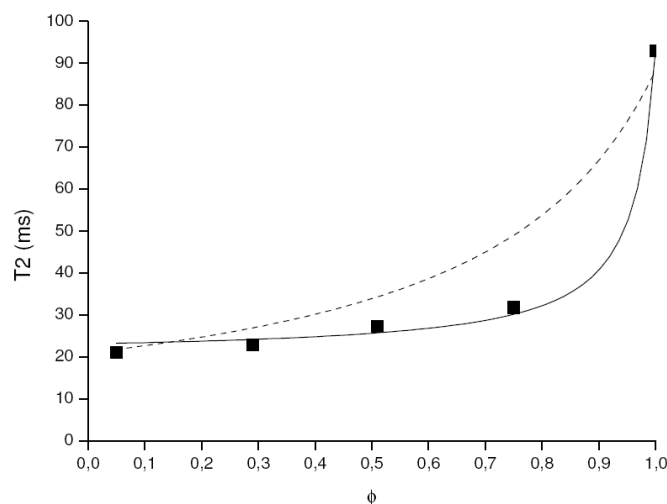
A 34. ábra az ozmotikus kísérletek során mért  $T_2$  relaxációs időket ábrázolja.



**34. ábra -  $T_2$  relaxációs idő  $\phi$  függvényében. A vonalak a 300 mOsm adatokra illesztett egyenessel párhuzamosak (ld. 31. ábra). A szimbólumok a különböző ozmolaritásokat jelölik: 220 mOsm (■), 260 mOsm (▲), 400 mOsm (▼) és 500 mOsm (◆) [78].**

A  $T_2$ - $\phi$  görbék alacsonyabb  $T_2$  értékek irányában tolódnak el, ahogyan az extracelluláris tér ozmolaritása 220 mOsm értéktől 500 mOsm értékig változik.

A  $T_2$  relaxációs idő viselkedésének kísérleti eredményei arra mutatnak rá, hogy az egyszerű elméleti megközelítés, amely szerint a bolyongást végző vízmolekulák különböző kompartmentekben való tartózkodási ideje arányos a kompartmentek térfogatával, nem helytálló. Ez a feltételezés alulbecsli az IC tartomány hatását a relaxációban. A 35. ábra illusztrálja a problémát.



**35. ábra -  $T_2$  az EC térfogatfrakció ( $\phi$ ) függvényében. Az adatpontok 5% albumin tartalmú VVT szuszpenziókra mérési eredményeit ábrázolják. Az elméleti görbék: szaggatott vonal – térfogati súlyozás, folytonos vonal – diffúzió és térfogati súlyozás. Az egyszerű térfogati súlyozás alulbecsli a  $T_2$  relaxáció időt a nagyobb  $\phi$  tartományban. Az elméleti görbék illesztésénél a független paraméterek a  $T_2$  relaxációs idők  $\phi=0$  és  $\phi=1$  mellett felvett értékei voltak. A diffúzió-korrigált súlyozásnál a  $(D_e)_{\phi=0}/(D_e)_{\phi=1}$  paraméter értéke 0,15 volt, megegyezően a 30. ábra értékeinek megfelelően.**

A diffúzió-korrigált eljárás röviden a következőkben foglalható össze. Egy Brown-mozgást követő részecske trajektóriáján az IC és EC tereket egyaránt bejárja, amennyiben erre a mérés során megfelelő idő áll rendelkezésre (ergodikus határérték). A tartományok különböző relaxációs idővel jellemezhetők.  $T_{2EC}$  és  $T_{2IC}$ . A relaxáció valószínűsége a trajektórián  $\tau$  idő alatt a szóban forgó tartományokban:  $1/T_{2EC}$ , ill.  $1/T_{2IC}$ . A teljes trajektórián eltöltött idő IC térben eltöltött időre és EC térben eltöltött időre bontható:  $\tau_{IC}$ , és  $\tau_{EC}$ , ezek a trajektória vonatkozó szakaszaira jellemző részecskemobilitásból származtathatók. Ezt figyelembe véve a trajektóriára vett átlagos relaxációs időre a következő összefüggés írható fel.

$$\frac{1}{T_2} \left( \frac{\phi}{D_{ec}} + \frac{1-\phi}{D_{ic}} \right) = \frac{1}{T_{2ic}} \frac{1-\phi}{D_{ic}} + \frac{1}{T_{2ec}} \frac{\phi}{D_{ec}} . \quad (39)$$

Az átlagos relaxációs valószínűség mérhető paraméterekkel kifejezve (39-ből néhány egyszerű lépéssel):

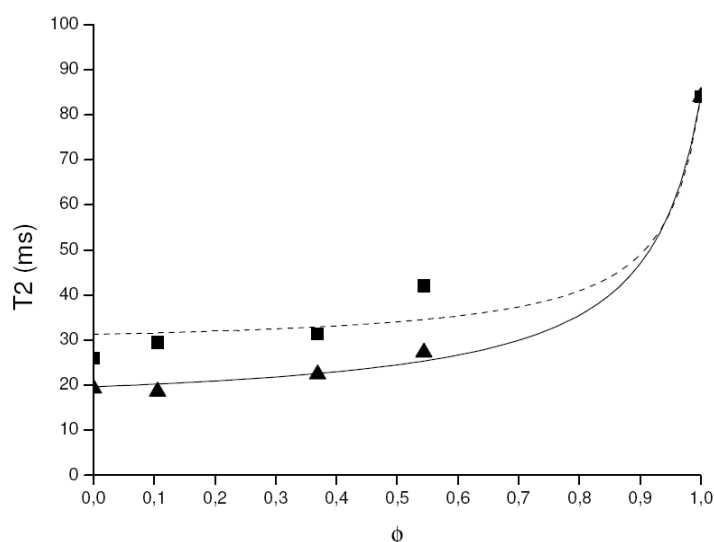
$$\frac{1}{T_2} = \frac{\frac{1}{T_{2\phi=0}}(1-\phi) + \frac{1}{T_{2\phi=1}}\phi \frac{(D_e)_{\phi=0}}{(D_e)_{\phi=1}}}{\phi \frac{(D_e)_{\phi=0}}{(D_e)_{\phi=1}} + (1-\phi)} . \quad (40)$$

(40) kifejezés a  $(D_e)_{\varphi=0}/(D_e)_{\varphi=1} = 1$  esetben (amikor a kompartmentekben a diffúziós tényező azonos), az egyszerű térfogati súlyozás kifejezését adja. Továbbá a  $\varphi \rightarrow 1$  és  $\varphi \rightarrow 0$  esetekben is természetesen a megfelelő eredményre vezet.

Ez a megközelítés a heterogén közeg relaxációjára jobb közelítést ad (ld. 35. ábra).

Továbbá, mivel  $\lim_{\varphi \rightarrow 0} (1/T2)_{\varphi} = (1/T2)_{\varphi=0}$ , a (40) kifejezés magyarázatot ad  $T2$ -nek a 34. ábrán illusztrált viselkedésére, mivel  $T2$  -t  $(D_e)_{\varphi=0}/(D_e)_{\varphi=1} = 1$  határozza meg az alacsonyabb  $\varphi$  tartományban.

A 36. ábra szerint a diffúzió-korrigált térfogati súlyozás az ozmotikusan módosított szuszpenziók viselkedését helyesen írja le.



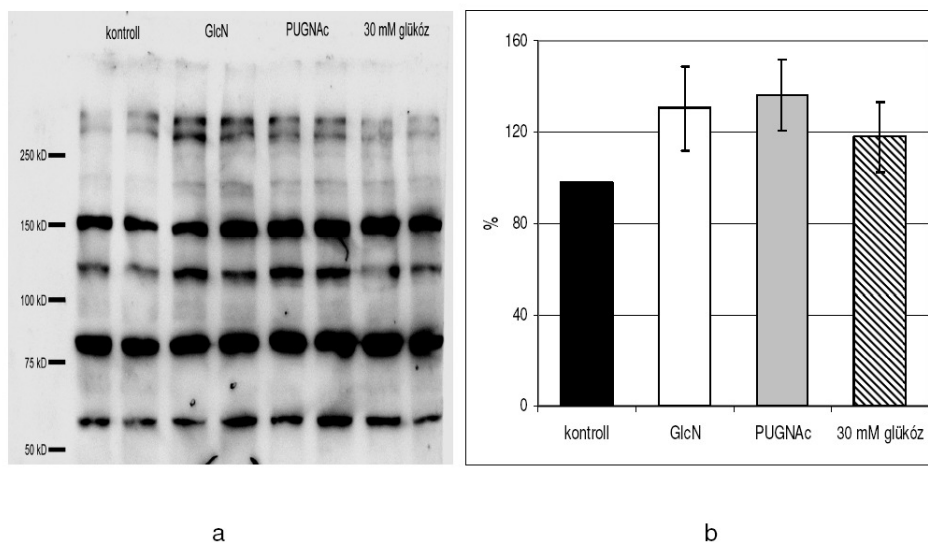
**36. ábra – Az adatpontok VVT 10% albumint tartalmazó szuszpenzióinak  $T2$  értékeit ábrázolják, különböző ozmolaritás mellett: 220 mOsm (■) és 500 mOsm (▲). A görbék a diffúzió-korrigált térfogati súlyozás elméleti illesztett görbéit jelölik.**

E megközelítés hibája, hogy figyelmen kívül hagyja a véges sejtmembrán permeabilitást ( $\kappa < 1$ ). Természetesen a (31) kifejezés érvényét veszti  $\kappa = 0$  esetben. A véges permeabilitás miatt (39) alulbecsli a  $T2$  értékeket a magasabb  $\varphi$  tartományban. Érdeemes megjegyezni, hogy (39) összefüggés alapja a trajektóriákra vett átlagból származik. Novikov és munkatársainak tanulmánya a trajektóriák szerinti átlagszámítás részletesebb spektroszkópai alkalmazása [34].

## Intracelluláris tér módosulásai

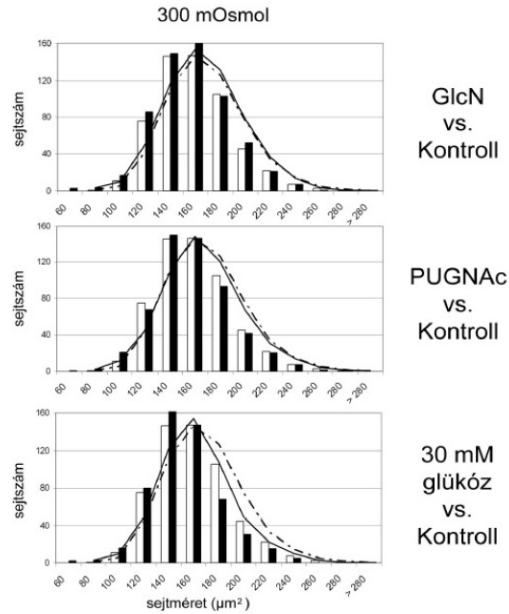
Az intracelluláris tér diffúziós tényezőre és T2 relaxációra való hatásának vizsgálata a sejtek glükóz, glükózamin és PUGNAc tartalmú médiumban való inkubással történt.

A 37. ábra a fehérje elektroforézis vizsgálatok eredményét mutatja. Az O-GLcNAc fehérjék specifikus antitesttel (CTD110.6, mouse IgM) való jelölésével, Western blot módszerrel az O-GLcNAc fehérjék mennyisége meghatározható. Az inkubálás hatására a O-GLcNAc fehérjék mennyisége szignifikánsan megnőtt (kétmintás  $t$ -próba, kontroll és kezelt,  $p < 0,01$ ).



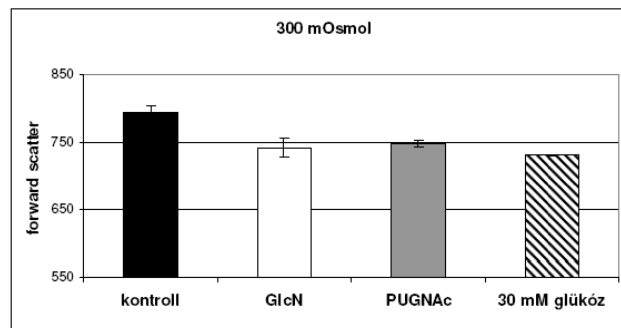
37. ábra

A kezelt sejtek izoozmotikus szuszpenziójában a sejtméret változása fénymikroszkóppal történő ellenőrzése a 38. ábrán látható eredményeket hozta. A sejtek mérete a kezelés hatására nem változott szignifikánsan (kétmintás  $t$ -próba,  $p < 0,05$ ).



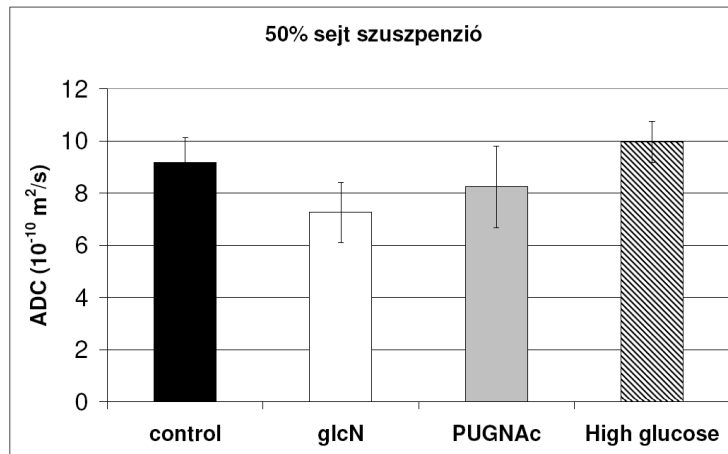
38. ábra

Ugyanakkor, a sejtek flow-citometriás mérései a kezelt sejtek optikai tulajdonságának szignifikáns megváltozását igazolták (forward scattering, kétmintás  $t$ -próba, kontroll és kezelt,  $p < 0,01$ ), ld.:39. ábra.



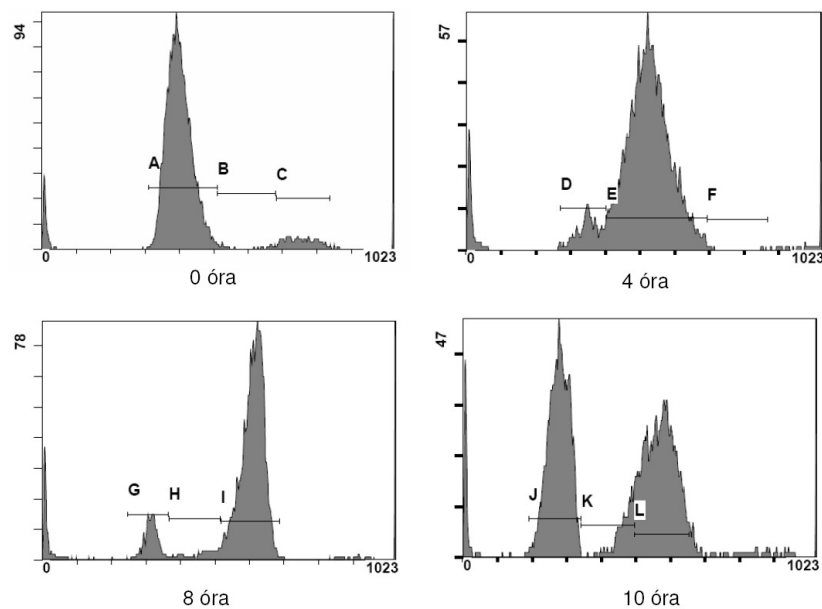
39. ábra

Az 50%-os IC tartalmú sejtszuszpenzió végzett MR mérések a diffúziós tényező szignifikáns megváltozását igazolták ld. 40. ábra (kétmintás  $t$ -próba, kontroll és kezelt). A glükózzal kezelt és kontroll sejtek szuszpenziója diffúziós tényezője között nincs szignifikáns különbség, a kontroll és GlcN és kontroll között szignifikáns ( $p < 0,01$ ), a PUGNAc és kontroll között gyengébb, de szignifikáns különbség található ( $p < 0,05$ ). A szuszpenziók T2 relaxációs ideje a mérés hibáján belül azonos volt.



40. ábra

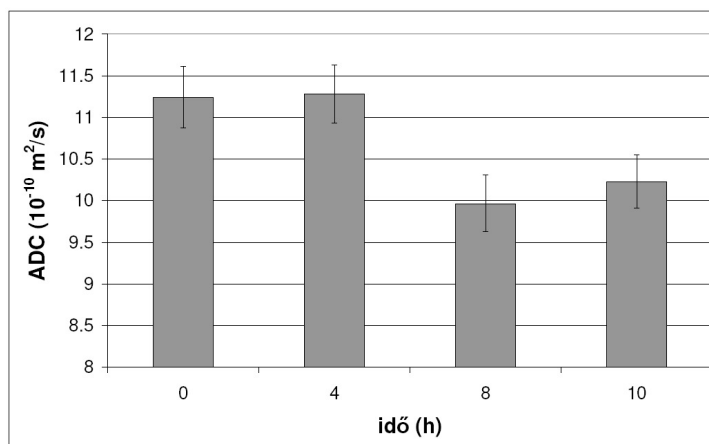
A sejtszinkronizációs kísérletek a következő eredményre vezettek. A 41. ábrán láthatók a flow-citometriás eredmények a szinkronizációt követő 0., 4., 8. és 10. órában. A sejtpopuláció eloszlásában bekövetkező változások jól látszanak. A 8. órában a sejtpopuláció legnagyobb része a G2 fázisban található.



41. ábra

Az ezzel egy időben végzett MR diffúziós mérések eredményei e sejtpopulációk 50%-os IC tartalmú szuszpenzióján, a 42. ábrán láthatók. A G2 fázisú populáció a többi fázisú

populációtól szignifikánsan eltérő diffúziós tényezőt eredményez (kétmintás  $t$ -próba, kontroll és kezelt,  $p < 0,01$ ).



**42. ábra**

A szuszpenziók T2 értékei között szignifikáns különbség nem mutatkozott, az értékek hibán belül azonosak voltak.



## Diszkusszió, további lehetőségek

Az diffúziós MR képalkotás elterjedése a korai ischémiás stroke diagnózis sikerében rejlik, egyben ez a módszer könnyen hozzáférhető módon szolgáltat objektív fizikai paramétereket. A kvantitatív elemzések azt mutatják, hogy az ischémiás területen a szöveti víz diffúziója mintegy a felére csökken, melynek celluláris, molekuláris okait leginkább az ischémiát követő citotoxikus ödémával ill. celluláris térfogatszabályozással hozzák összefüggésbe. Ugyanakkor számos kísérleti eredmény cáfolja ezt az elképzelést, mely alternatív elméleti és patofiziológiai megfontolásokat tesz szükségessé. Kutatásaink egyik fókuszát az intracelluláris tér potenciális változásai ill. annak hatása a víz diffúziójára jelentette, másrészt modellkísérletben teszteltük a „klasszikus” teória predikcióit.

Az ischémia okozta nagymértékű intracelluláris proteolízis régóta ismert jelenség, melynek diffúzióra gyakorolt hatását eddig nem vizsgálták. A modellkísérleteink problémafelvetése abból a radiológiai megfigyelésből származik, amely szerint a korai ischémia esetén a diffúzió-súlyozott MR képek és a T2 súlyozott képek nem korrelálnak egymással. Az oldatokkal végzett kísérletsorozatban homogén közegek oldott molekuláinak hatását vizsgáltuk. Munkahipotézisünk a következő volt: az ischémiás régióban a metabolikus folyamatok leállnak, és a gyors proteolízis miatt az intracelluláris fehérjék (az „oldat”) komponensei megváltoznak. A dezintegráció előrehaladtával az oldott molekulák mérete csökken, a 12. ábrán illusztrált változás tételezhető fel a komponensek spektrumában. Ez az oldott molekulák tömegét és koncentrációját is érintő folyamat. Továbbá a molekulák darabolódásának következményeként az oldat komponensei hidrofilitásukat és/vagy hidratációs összfelületeiket illetően is megváltoznak. Az ADC a víztartalomra is érzékeny mérési paraméter. A munkahipotézisben feltételezett változás ADC-re gyakorolt hatása mögött olyan mikroszkopikus jelenségek húzódnak, mint a lehetséges bolyongási térfogat geometriájának, térfogatának megváltozása, amelyek a víz diffúzióját korlátozzák. A relaxáció változása az oldott molekulák vízzel való interakciójának megváltozásából következhet, a relaxációs helyeken való tartózkodási idők megváltozásán keresztül. A radiológiai probléma megválaszolásához az oldott molekulák spektrumában bekövetkező változásokat egymástól függetlenül (koncentráció, molekulatömeg, molekulák minősége) modelleztük, az oldat ADC és T2 relaxációs idejének monitorozása mellett.

A megfigyelések alapján a következő megállapítások tehetők. Az ADC értéke elsősorban a koncentrációtól függ (ld.: 19. ábra, 20. ábra). A molekulatömeg hatása az ADC értékére nem elhanyagolható, ugyanakkor elmondható, hogy biológiai értelemben igen drasztikus

változásnak kell beállnia az oldott molekulák tömegében, hogy az, az ADC értékében tetten érhető legyen (ld.:  $a \rightarrow b$ , ill.  $a \rightarrow c$  változások, 23. ábra). Kvantitatív következtetéseket csak konkrét oldott molekula esetén lehet és érdemes levonni. A T2 relaxációs idő ezzel szemben molekulatömeg változásától erős függést mutatott, miközben a koncentrációtartomány egy széles tartományában (10%-25%) gyakorlatilag nem függ a koncentrációtól (ld.: 21. ábra, 22. ábra).

Az oldatkísérletek alapján feltételezhető, hogy az ischémia okozta intracelluláris proteolízis egy olyan fehérje koncentráció-változást hoz létre, mely az ADC változását vonja maga után, miközben a T2 értékében nem áll be változás. (Azok a folyamatok pedig, amelyek koncentráció-változás nélkül, az oldott molekulák tömegének változásával járnak (pl. fehérje polimerizáció), a T2 változásával járnak, miközben az ADC értéke nem változik.) Ezek az eredmények lehetséges magyarázatot adnak arra, hogy miért nem korrelál az ADC és T2 értékek változása a korai ischémias területeken.

Nem elhanyagolható szempont ugyanakkor, hogy az intracelluláris tér nem feltétlenül ill. korlátozott mértékben modellezhető fehérje vagy egyéb polimer oldatokkal, azaz a biológiai szövetekre a laboratóriumi oldatoknál megszokott koncentráció fogalom nem feltétlenül alkalmazható [2]. Elképzelhető, hogy a fehérjék konformációjának vagy aggregációjának megváltozásával a tényleges szárazanyagtartalom nem változik ugyan, de az oldószer víz számára az oldatban újabb interakciós felületek jelennek meg. Ezáltal a vízmolekulák bolyongási trajektóriáihoz megnövekedett kölcsönhatási valószínűséget kell rendelni, hasonlóan, mint a megnövekedett szárazanyagtartalom esetében, azaz a szárazanyagtartalom változása nélkül az ADC értéke csökkenhet. A fehérjék intracelluláris állapota, interakciója természetesen sokféle folyamatban változik, mely a víz diffúzióját kisebb-nagyobb mértékben befolyásolni tudja.

A fehérje-, ill. vízkoncentrációk változásának a „klasszikus” teória szempontjából is lehet fontossága, mégpedig az EC $\rightarrow$ IC vízáthelyeződés során két kompartment fehérje koncentrációja változik. Míg az IC térfogatban a koncentráció csökken, addig az EC térfogatban nő. Ezek egymással ellentétesen befolyásolhatják az egész heterogén térfogat ADC értékét. Ez utóbbi problémakör megértését szolgálják a VVT szuszpenzióval végzett kísérletek.

Az oldatoknál jóval bonyolultabb rendszernek minősül az EC tértől mentes VVT szuszpenzió. Az intracelluláris crowding kísérletekben ilyen minták ADC értékének vizsgálata történt. A sejtes állomány elsősorban abban különbözik az egyszerű oldatoktól, hogy a sejtes állomány sejtmembránjai a diffúziót korlátozzák, továbbá az intracelluláris térfogat annak ellenére,

hogy protein tartalma 95%-ban hemoglobin, nem tekinthető egyszerű oldatnak. A tevéritrociták és humán eritrociták összehasonlítása egyedülálló lehetőséget nyújt a víz-protein interakciók víz diffúzióját befolyásoló hatásának vizsgálatában, mivel a humán és tevéritrociták hemoglobinja eltérő hidrofilitású. Ugyanakkor az eritrociták ozmotikus manipulációja útján a víztartalom változására adott válaszuk is összehasonlítható. A membránok (és ezzel együtt az ahhoz kötődő fehérjék) hatása a víz diffúziójára a fajok között eltérő lehet [62], ennek az ADC értékben való megjelenését a humán és tevéritrociták esetében kizárhatjuk [63]. A sejtek alakja a diffúziót szintén befolyásolja, a humán VVT-k biconkáv alakúak (izoozmotikus körülmények mellett), a tevé VVT-k pedig ellipszoid alakúak. A magasabb *b*-érték mellett történt diffúzió-diffrakciós mérések az ozmotikusan manipulált sejtek ADC értékei között különbségek felmerülhetnek [64], kísérleteinkben a *b*-érték messze elmaradt ettől a tartománytól. Mindezek fényében, a kísérletekben az eritrociták IC tartományának fő összetevője, a hemoglobin vízzel történő kölcsönhatása tekinthető az ADC meghatározó tényezőjének. Kísérleti eredményeink azt is megmutatták, hogy in vitro a tevé hemoglobin oldatokban az ozmotikusan inaktív víztartalom magasabb, mint a humán hemoglobin esetén. Ezzel összhangban, a tevéritrociták ozmotikusan inaktív víztartalma relatív és abszolút értékben is magasabb, mint a humán eritrocitáké. Az ADC értékek a tevéritrociták mintáján alacsonyabb, mint a humán esetben. Mivel a humán eritrociták víztartalma magasabb, mint a tevéritrocitáké, ezért a hemoglobin molekulák és a víz molekulák kölcsönhatásán kívül a koncentráció-különbségek is szerepet játszanak. A tevéritrocitáknál mért víztartalomra történő dehidráció után a humán eritrocitákon mért ADC érték közelíti a tevé mintán mért értéket.

Ezen kísérleti eredmények alapján elmondható, hogy a sejtmembránok jelenléte befolyásolja a diffúziós folyamatot, ugyanakkor az intracelluláris tér sajátosságaival jól korrelálnak a sejtes állományon végzett kísérletek eredményei. Az IC tér molekuláinak minősége és koncentrációja is hatással van az ADC értékre (ld. 28. ábra). Ugyanakkor elmondható, hogy az ADC értékét elsősorban a koncentráció határozza meg (ld. 1. táblázat, 27. ábra tevé adatok, 29. ábra dehidrált humán eritrocita adatok). Ez a megállapítás összhangban van a különböző minőségű (hidrofilitás), molekulatömegű és méretű (perzisztenciahossz) molekulák oldatain végzett kísérleti eredményekkel. Az intracelluláris tér oldatokkal való modellezésének korlátaira mutat rá az a tény, hogy az eritrociták és a hemoglobin oldatok ozmotikus rezisztenciája különböző értéket ad. E különbség valószínűleg az oldott molekulák aggregációjából fakad [65].

A VVT szuszpenzió végzett kísérletekkel az volt a célunk, hogy az ischémiás szövetekben a "klasszikus" teória szerint lejátszódó intracelluláris és extracelluláris folyamatokat modellezzük. A DWI jelváltozások molekuláris mechanizmusait számos tanulmány részletezi [22, 66-68], mely szerint a DWI citotoxikus ödémára utal, amely az EC→IC kompartmentek közötti vízáthelyeződéssel jár. Így az EC tér protein koncentrációja a normális 2-4% (tömeg/térfogat) értékről akár a négyszeresére is nőhet [69, 70], az EC tér térfogatfrakciójának csökkenéséből fakadóan [71, 72]. A kísérletekben alkalmazott protein koncentráció ezt a tartományt lefedi.

A fenti kísérleti modellrendszer eredményeit az elméleti EMT modell jól közelíti. A modell nagy diffúziós időkre érvényes, pontosabban olyan hosszú diffúziós időkre, amely alatt a bolyongó vízmolekulát az EC és IC teret egyaránt bejárják. A kísérleti modell a vízmolekulák diffúzióját illetően, a mérési tartományban ergodikusan tekinthető.

A kísérleteinkből levonható az a következtetés, hogy a mért diffúziós tényező a sejtsuszpenzióban nem függ az extracelluláris tér oldott molekuláinak minőségétől (oldatkísérleteink eredményei is ezt támasztják alá). A 30. ábra szemlélteti, hogy a diffúziós tényezőt nem befolyásolja az EC térben oldott molekulák kémiai minősége, az extracelluláris tér térfogatfrakciójának ( $\phi$ ) széles tartományában. Ugyanakkor, ahogy az oldatkísérletekben láttuk az ADC értéke lineárisan függ az oldott molekulák koncentrációjától (ld. 19. ábra). Az intracelluláris tér hidráltóságának növelése (ischemia esetében gyakran felmerülő EC→IC vízáthelyeződés) felmerül, mint a szövetben mért ADC változás egyik tényezője. A 32. ábra jól illusztrálja, hogy ez a folyamat (a kísérleti mérési tartományban) önmagában nem vezet az ADC változásához. Az ezzel párhuzamosan történő EC tér koncentrációjának növekedése azonban a fentiekben ismertetett módon csökkenti a minta ADC értékét. A kísérletek és azt támogató elméleti modell alapján feltételezhető, hogy azok a kóros folyamatok, amelyek az extracelluláris tér oldott anyag koncentrációjának növekedésével járnak, az ADC értékének csökkenését vonják maguk után, függetlenül az IC tér koncentrációjának változásától. Az ADC e viselkedését a 33. ábrán szemléltetett összefüggés is alátámasztja.

A transzverzális relaxációs idő ( $T_2$ ) az agyi kóros folyamatok diagnosztizálásában szintén kulcsszerepet játszik. Jól ismert jelenség, hogy a stroke bekövetkezését követően, csak órák után mutatkozik  $T_2$  változás az érintett területen [73]. Állatkísérletek igazolják, hogy a stroke akut szakaszában egy gyors  $T_2$  csökkenés után (csökkent oxyhemoglobin szint) az ischémiás lézió központi régiójában fokozatos  $T_2$  növekedés valósul meg [74, 75]. Kísérleteinkben számos biofizikai faktor vizsgálata történt. Habár a VVT szuszpenzió nyilvánvalóan

különbözik az agyszövetektől, kísérleti eredményeink támpontot adhatnak a relaxáció alakulását illetően [22, 76].

Az EC tér csökkenésével T2 értéke lineárisan csökken (ld.: 31. ábra). Sem az EC térben oldott molekulák koncentrációja, sem azok minősége nem befolyásolta a mintában mért T2 relaxációs időt. Ezzel szemben az IC hidráltsága jelentősen befolyásolja a T2 értéket (ld.: 34. ábra). A stroke során a két effektus egymással ellentétes irányban hat. Az EC tér csökkenése kompenzálhatja az IC víztartalom növekedésének hatását. Így feltehető, hogy a stroke során tapasztalt lassú T2 növekedés már a vazogén és a citotoxikus ödéma együttes jelenlétére utal. Ez utóbbi nagyobb intracelluláris víztartalommal jár. Ebből következőleg a T2 értékének fokozatos növekedése a teljes víztartalom növekedését jelzi, függetlenül attól, hogy ez az intra-, vagy extracelluláris térben valósul meg.

Az EMT modell kiváló matematikai eszköznek bizonyult a kísérleti eredmények értékelésében. Ez a modell szolgálhat alapul olyan komplex folyamatok ADC-re kifejtett hatásának jóslásában, ahol az EC és IC tér egyaránt változik. A modell érvényességét az ergodikusság szabja meg. Alacsonyabb permeabilitású sejtek esetén, illetve rövidebb diffúziós idők esetén a modell érvényességét vesztheti. A modellkísérletek alapján olyan kóros folyamat-modell állítható fel, amely az ADC és T2 változásában megfigyelt korrelátlanságot igazolja, a megfigyelt T2 és ADC változások mellett.

A VVT szuszpenziós kísérletek eredményei felvetik annak a lehetőségét, hogy az intracelluláris térben bekövetkező molekuláris változások egy heterogén, extra-, és intracelluláris teret egyaránt tartalmazó mintában, a mért diffúziós tényező, illetve a T2 relaxációs idő változásában is megnyilvánuljanak. Az O-glükolizációs egyensúly eltolódása különböző kóros folyamatok során következhet be. Az O-glükolizált fehérjék számának felszaporodása az intracelluláris térben megfigyelhető a diabetes, gyulladásos folyamatok, tumor kialakulása és apoptózis során is. Az O-glükolizációs egyensúly eltolódása reverzibilis módon, mesterségesen előidézhető. Az így megfigyelt ADC érték változása szignifikánsnak mutatkozott 50%-os intracelluláris térfogatfrakció esetén is (ld.: 40. ábra). Ugyanakkor nem mutatkozott szignifikáns változás a T2 értékben. A teve és humán eritrocitákon végzett kísérletekkel összevetve, ez a kísérleti eredmény nem meglepő. Az O-glükolizációs egyensúly eltolódása az intracelluláris fehérjeállomány hidrofilitásának megváltozását jelenti, ugyanakkor egyéb jelentős IC térbeli változás nem kötődik ehhez a folyamathoz. Az O-glükolizációs egyensúly eltolódása nem okozott sejtméret változást sem (ld.: 38. ábra). Habár az ADC értéke leginkább a koncentrációk függvénye, a teve és humán eritrociták esetében is megmutatkozott a hemoglobinmolekulák közötti különbség az ADC értékben (ld.: 1.

táblázat). Az ADC alakulását a molekulák minősége is befolyásolja. Az oldatkísérletekkel ez a következtetés összhangban van (ld.: 19. ábra). A T2 értéket az intracelluláris molekulák minősége is befolyásolja. Az az eredmény, hogy a T2 értékében nem tapasztalható változás az O-glükolizáció hatására, további vizsgálódás tárgyát kell, hogy képezze. A relaxációs folyamatok leírása a protein-víz interakciók egyszerű mennyiségi analízisével nem lehetséges. A kísérleti eredmény elvi lehetőséget teremt in-vivo MR diagnosztikai eljárás számára. Az eljárás gyakorlati értékét az effektust illető jel-zaj viszony határozza meg. Az eredmények in-vivo állatkísérleteken ellenőrizhetők, az MR mérések és szövetminta flow-citometriai mérései összevethetők. Az MR diffúziós kísérletek hangolása is része egy gyakorlati eljárás kidolgozásának.

Az intracelluláris milliő jellegzetes megváltozása várható a sejtciklus bizonyos fázisaiban. A sejtmag állományának duplikálódása, a citoszkeleton átrendeződése, a mikrotubulusok polimerizációja mind olyan folyamat, amely a protein-víz interakciójában lényeges változásokkal járhat. Így feltételezhető, hogy e változások, akár egy 50%-os intracelluláris térfogatfrakciójú sejtuszuspenzióban is tetten érhetők az ADC és a T2 változásain keresztül. A sejtciklus fázisai azonban normális esetben, az időtől függetlenül, a hosszuk arányában vannak képviselve egy adott sejtpopulációban. A sejtek fázisának szinkronizációjával a populáció azonos fázisba hozható. Ezután a teljes populáció szinkronban, azonos fázisban halad a természetes sejtcikluson át. Egy szinkronizált populációban tehát az idő függvényében az intracelluláris tér változásai várhatók, amelyek feltételezhetően az ADC és a T2 értékek változásában tetten érhetők. Ezt a munkahipotézist ellenőrzi és erősíti meg a HeLa sejtvonallal folytatott sejtszinkronizációs kísérletsorozat. A kísérletek során a G2 fázis alatt szignifikáns ADC érték csökkenés figyelhető meg (ld.: 41. és 42. ábra). A kísérletek érdekessége, hogy a T2 értékekben nem következett be szignifikáns változás. Ez további magyarázatra szorul. A kísérlet azon túl, hogy igazolja az intracelluláris történések ADC értékben való megjelenését intakt sejtekből álló szuszpenzióban, további lehetőségeket kínál. A tumoros betegségben szenvedők kemoterápiás kezelése olyan citotoxikus szerek alkalmazását jelenti, amelyek sejtszinkronizációhoz vezetnek. A sejtszinkronizáció in-vivo MR igazolása, annak mértékének számszerűsítése nyilvánvaló gyakorlati előnyökkel jár. E kísérletsorozat eredményei elvi lehetőséget nyújtanak állatmodelleken való alkalmazásra, citotoxikus szerek hatásának in-vivo vizsgálatára.

## Köszönetnyilvánítás

Nem könnyű orvosi relevanciájú területen fizikai problémákkal foglalkozni. Szükséges hozzá a magas technológiai háttér, szoros kapcsolat a napi gyakorlattal a betegellátásban, a diagnosztikai gyakorlati problémák természettudományos megfogalmazása, és elsősorban az igény, hogy a rendelkezésre álló technológiát a legjobban kihasználjuk. A Kaposvári Egyetem Egészségtudományi Centrumának Onkoradiológiai osztályának dolgozójaként (2004-2007) olyan környezet vett körül, ahol a legmodernebb MR, CT és besugárzási technika is rendelkezésre állt. Ebben a közegben lehetőségem nyílt arra, hogy betekintést nyerjek az orvosi területen alkalmazott fizika aktuális kérdéseibe. Ez a munkahely az MR fizikáját illető kutatásaimat mindig támogatta.

Külön köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Repa Imrének, a Kaposvári Egyetem Diagnosztikai és Onkoradiológiai Központ igazgatójának, aki találkozásunk első pillanatától kezdve támogatott kutatásaimban, fizikusként alkalmazott, és a nehezebb időszakokban is ösztönzött. Az ő személyes támogatása, valamint az általa vezetett intézmény által biztosított háttér nélkül nem nyílt volna lehetőségem az orvosi fizikával foglalkozni.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Bogner Péternek, a Kaposvári Egyetem Egészségtudományi Centruma elnökének, hogy figyelmemet az MR képkalkotásban felmerülő problémákra irányította, hogy témavezetőmként a kutatási irány és módszerek kiválasztásánál támogatott. Külön köszönet illeti a diagnosztikai problémák természettudományos megfogalmazásáért és a kutatási eredmények diagnosztikai relevanciájának értékeléséért, és azokért az évekért, amelyekben önszerveződő kutatócsoportot alkottunk.

Dr. Berente Zoltánnak, a Pécsi Tudományegyetem Biokémiai Intézete docensének szeretném megköszönni, hogy az MR kísérletek tudományában mindenben segítségemre volt a kísérletek megtervezésétől az eredmények értelmezéséig. További köszönet illeti őt a számtalan ötpercesnek induló, de órákig tartó beszélgetésért a természettudományról. Köszönöm Prof. Dr. Sümegi Balázsnak, a Pécsi Tudományegyetem Biokémiai Intézet vezetőjének, hogy kísérleteimhez az MR berendezést rendelkezésemre bocsájtotta.

Köszönetet szeretnék mondani fizikus kollégáimnak, Antal Gergelynek és Glavák Csabának a Kaposvári Egyetem Egészségtudományi Centrumának Onkoradiológiai osztályán, akik a munkamegosztásban mindig rugalmasak voltak és a fizikai problémák diszkussziójára mindig készen álltak.

Köszönet illeti meg Dr. Miseta Attila egyetemi tanárt, a Pécsi Tudományegyetem Laboratóriumi Medicina Intézet igazgató helyettesét azért, hogy rendelkezésemre bocsájtotta

a klinikai laboratóriumi infrastruktúrát. Dr. Nagy Tamásnak köszönöm a sejtbiológiai háttér biztosítását, a sejtszinkronizációs és az O-glükolizációs kísérletekben való együttműködését. Köszönöm Dr. Sáfrány Gézának, az Országos "Frédéric Joliot-Curie" Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet Sugárbiológiai Főosztály vezetőjének a sejtszinkronizációs kísérletekben nyújtott támogatását és szakmai tanácsait.

Köszönöm ifj. Dr. Kellermayer Miklósnak a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet vezetőjének a számos részletes szakmai megbeszélést, amit a biológiai rendszerek mikroszkopikus skálán lezajló sztochasztikus folyamatairól folytattunk. Köszönöm Dr. Nagy Attilának a fluoreszcencia vizsgálatokban és a pepton oldatokkal folytatott kísérletekben nyújtott segítségét.

Végül pedig köszönetet szeretnék mondani szüleimnek, középiskolai és egyetemi tanárainak, akik a természettudományok és a matematika szeretetére tanítottak, és feleségemnek, aki mindvégig támogatott.



## Irodalomjegyzék

1. Diffusion and Perfusion Magnetic Resonance Imaging, editor: Denis Le Bihan, Raven Press, 1995.
2. Wiggins PM.: High and low density intracellular water.  
Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand). 2001 Jul;47(5):735-44. Review.
3. Szafer A, Zhong J, Anderson AW, Gore JC.: Diffusion-weighted imaging in tissues: theoretical models.  
NMR Biomed. 1995 Nov-Dec;8(7-8):289-96. Review.
4. Pfeuffer J, Flögel U, Dreher W, Leibfritz D.: Restricted diffusion and exchange of intracellular water: theoretical modelling and diffusion time dependence of <sup>1</sup>H NMR measurements on perfused glial cells.  
NMR Biomed. 1998 Feb;11(1):19-31.
5. Hazlewood CF, Rorschach HE, Lin C.: Diffusion of water in tissues and MRI.  
Magn. Reson. Med. 1991 Jun;19(2):214-6. Review.
6. Cameron IL, Kanal KM, Keener CR, Fullerton GD.: A mechanistic view of the non-ideal osmotic and motional behavior of intracellular water.  
Cell. Biol. Int. 1997 Feb;21(2):99-113.
7. Cameron IL, Ord VA, Fullerton GD.: Water of hydration in the intra- and extra-cellular environment of human erythrocytes.  
Biochem. Cell Biol. 1988 Nov;66(11):1186-99.
8. Bogner P, Csutora P, Cameron IL, Wheatley DN, Miseta A.: Augmented water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camelids.  
Biophys. J. 1998 Dec;75(6):3085-91.
9. Agutter PS, Malone PC, Wheatley DN.: Diffusion theory in biology: a relic of mechanistic materialism.  
J. Hist. Biol. 2000 Spring;33(1):71-111.
10. Lanni F, Waggoner AS, Taylor DL.: Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy.  
J. Cell. Biol. 1985 Apr;100(4):1091-102.
11. J. Kertész: Percolation of holes between overlapping spheres: Monte-Carlo calculation of the critical volume fraction  
J. de Physique 42, L393 (1981)
12. Luby-Phelps K.: Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area.  
Int. Rev. Cytol. 2000;192:189-221.
13. Fullerton GD, Zimmerman RJ, Kanal KM, Floyd LJ, Cameron IL.: Method to improve the accuracy of membrane osmometry measures of protein molecular weight.  
J Biochem. Biophys. Methods. 1993 Jul;26(4):299-307.
14. Keener CR, Fullerton GD, Cameron IL, Xiong J.: Solution nonideality related to solute molecular characteristics of amino acids.  
Biophys. J. 1995 Jan;68(1):291-302.

15. Osamu Mishima , H. Eugene Stanley: Decompression-induced melting of ice IV and the liquid–liquid transition in water.  
Nature 392, 164-168 (12 March 1998)
16. M. Vedomuthu, S. Singh, G. W. Robinson: Properties of liquid water: Origin of the density anomalies.  
J. Phys. Chem. 98 (1994) 2222.
17. Robinson GW, Cho CH.: Role of hydration water in protein unfolding.  
Biophys. J. 1999 Dec;77(6):3311-8.
18. Makarov VA, Andrews BK, Smith PE, Pettitt BM.: Residence times of water molecules in the hydration sites of myoglobin.  
Biophys. J. 2000 Dec;79(6):2966-74.
19. Makarov VA, Feig M, Andrews BK, Pettitt BM.: Diffusion of solvent around biomolecular solutes: a molecular dynamics simulation study.  
Biophys. J. 1998 Jul;75(1):150-8.
20. Baranowska HM, Olszewski KJ.: The hydration of proteins in solutions by self-diffusion coefficients. NMR study.  
Biochim. Biophys. Acta. 1996 Apr 17;1289(3):312-4.
21. Crick F.: Diffusion in embryogenesis.  
Nature. 1970 Jan 31;225(5231):420-2.
22. Latour LL, Svoboda K, Mitra PP, Sotak CH.: Time-dependent diffusion of water in a biological model system.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1994 Feb 15;91(4):1229-33.
23. Simonyi Károly, Zombory László: Elméleti Villamosság 2.39. példa  
Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 2000. ISBN: 963 16 3058 7
24. E.J.Garbocki, J.G.Berryman: New effective medium theory for the diffusivity or conductivity of a multi-scale concrete microstructure model  
Concrete Science and Engineering, Vol.2., June 2000. pp 88-96.
25. J.-P. Hansen, I.R.McDonald: Theory of simple liquids  
Elsevier, 1986, ISBN: 0-12-323852-8
26. Archie G.E.: The electrical resistivity log as an aid in determining some reservoir characteristics  
Trans.Am.Inst.Min.Eng. 1942, 146: 54-61
27. Partha P. Mitra and Pabitra N. Sen: Effects of microgeometry and surface relaxation on NMR pulsed-field-gradient experiments: Simple pore geometries  
Phys. Rev. B 45, 143 - 156 (1992)
28. Partha P. Mitra, Pabitra N. Sen, Lawrence M. Schwartz, and Pierre Le Doussal: Diffusion propagator as a probe of the structure of porous media  
Phys. Rev. Lett. 68, 3555 - 3558 (1992)
29. K.E Brownstein, C.E. Tarr: Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells  
Phys. Rev. Lett. 19, 2446 - 2453 (1979)

30. P.T. Callaghan, A. Coy, D. Macgowan, K.J. Packer and F.O. Zelaya: Diffraction-like effects in NMR diffusion studies of fluids in porous solids  
Nature 351, 467 (1991).
31. P.T. Callaghan, D. MacGowan, K.J. Packer and F.O. Zelaya: High Resolution q-space imaging in porous structures  
Journal of Magnetic Resonance 90, 177 (1990).
32. Cory DG, Garroway AN.: Measurement of translational displacement probabilities by NMR: an indicator of compartmentation.  
Magn. Reson. Med. 1990 Jun;14(3):435-44.
33. J. E. Tanner: Transient diffusion in a system partitioned by permeable barriers. Application to NMR measurements with a pulsed field gradient  
J. Chem. Phys. 69, 1748 (1978)
34. Valerij G. Kiselev and Dmitry S. Novikov: Transverse NMR Relaxation as a Probe of Mesoscopic Structure  
Phys. Rev. Lett. 89, 278101 (2002)
35. P.T. Callaghan: Pulsed-Gradient Spin-Echo NMR for Planar, Cylindrical, and Spherical Pores under Conditions of Wall Relaxation  
Journal of Magnetic Resonance, Series A, Volume 113, Issue 1, March 1995, Pages 53-59
36. Philip W. Kuchel, Andrew Coy, Peter Stilbs: NMR "diffusion-diffraction" of water revealing alignment of erythrocytes in a magnetic field and their dimensions and membrane transport characteristics  
Magnetic Resonance in Medicine Volume 37, Issue 5, Date: May 1997, Pages: 637-643
37. Y. Cohen, Y. Assaf: High b Value q-Space Analyzed Diffusion-Weighted MRI: From in Vitro Spinal Cord to Multiple Sclerosis.  
NMR in Biomed.,15, 516-542 (2002).
38. Lori N.F., Conturo T.E., Le Bihan: Definition of Displacement Probability and Diffusion Time in q-Space Magnetic Resonance Measurements That Use Finite-Duration Diffusion-Encoding Gradients  
JMR 165, 185 (2003)
39. Moseley ME, Cohen Y, Mintorovitch J, Chileuitt L, Shimizu H, Kucharczyk J, Wendland MF, Weinstein PR.: Early detection of regional cerebral ischemia in cats: comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy.  
Magn. Reson. Med. 1990;14:330-46.
40. Sotak, CH.: Nuclear magnetic resonance (NMR) measurement of the apparent diffusion coefficient (ADC) of tissue water and its relationship to cell volume changes in pathological states.  
Neurochem. Int. 2004; 45:569-82.
41. van der Toorn A, Sykova E, Dijkhuizen RM, Vorisek I, Vargova L, Skobisova E, van Lookeren Campagne M, Reese T, Nicolay K.: Dynamic changes in water ADC, energy metabolism, extracellular space volume, and tortuosity in neonatal rat brain during global ischemia.  
Magn. Reson. Med. 1996; 36: 52-60.

42. Anderson AW, Zhong J, Petroff OA, Szafer A, Ransom BR, Prichard JW, Gore JC.: Effects of osmotically driven cell volume changes on diffusion-weighted imaging of the rat optic nerve. *Magn. Reson. Med.* 1996; 35:162-7.
43. Thelwall PE, Grant SC, Stanisz GJ, Blackband SJ.: Human erythrocyte ghosts: exploring the origins of multiexponential water diffusion in a model biological tissue with magnetic resonance. *Magn. Reson. Med.* 2002; 48:649-57.
44. O'Shea JM, Williams SR, van Bruggen N, Gardner-Medwin AR. Apparent diffusion coefficient and MR relaxation during osmotic manipulation in isolated turtle cerebellum. *Magn. Reson. Med.* 2000; 44:427-32.
45. van Pul C, Jennekens W, Nicolay K, Kopinga K, Wijn PF.: Ischemia-induced ADC changes are larger than osmotically-induced ADC changes in a neonatal rat hippocampus model. *Magn. Reson. Med.* 2005; 53:348-55.
46. Hsu EW, Aiken NR, Blackband SJ. Nuclear magnetic resonance microscopy of single neurons under hypotonic perturbation. *Am. J. Physiol.* 1996 Dec;271(6 Pt 1):C1895-900.
47. Blackband SJ, Bui JD, Buckley DL, Zelles T, Plant HD, Inglis BA, Phillips MI. MR microscopy of perfused brain slices. *Magn. Reson. Med.* 1997; 38:1012-5.
48. Cameron IL, Ord VA, Fullerton GD.: Water of hydration in the intra and extra-cellular environment of human erythrocytes. *Biochem. Cell. Biol.* 1988;66:1186e99.
49. Waldeck RA, Kuchel PW, Lennon AJ, Chapman BE.: NMR diffusion measurements to characterize membrane transport and solute binding. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 1997;30: 39e68.
50. Bogner P, Sipos K, Ludany A, Somogyi B, Miseta A.: Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes. *Eur. Biophys. J.* 2002;31:145e52.
51. Horn P, Munch E, Vajkoczy P, Herrmann P, Quintel M, Schilling L.: Hypertonic saline solution for control of elevated intracranial pressure in patients with exhausted response to mannitol and barbiturates. *Neurol. Res.* 1999;21:758e64.
52. Takayama H, Kobayashi M, Sugishita M, Mihara B.: Diffusion weighted imaging demonstrates transient cytotoxic edema involving the corpus callosum in a patient with diffuse brain injury. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2000;102:135e9.
53. Liu KF, Li F, Tatlisumak T, Garcia JH, Sotak CH, Fisher M, et al.: Regional variations in the apparent diffusion coefficient and the intracellular distribution of water in rat brain during acute focal ischemia. *Stroke* 2001;32:1897e905.
54. Peter Bogner, Attila Miseta, Zoltan Berente, Attila Schwarcz, Gyula Kotek, Imre Repa: Osmotic and diffusive properties of intracellular water in camel erythrocytes: Effect of hemoglobin crowdedness *Cell. Biol. Int.* 2005 Sep;29(9):731-6.

55. Yagil R, Sod-Moriah UA, Meyerstein N. Dehydration and camel blood. Osmotic fragility, specific gravity and osmolality.  
Am. J. Physiol. 1974;226:305e8.
56. Bogner P, Csutora P, Cameron IL, Wheatley DN, Miseta A.: Augmented water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camelids.  
Biophys. J. 1998;75:3085e91.
57. Gamliel, Levanon: Stochastic Processes in Magnetic Resonance,  
World Scientific Publishing 1995, ISBN: 9810222270
58. Bruce Alberts et al.: Molecular Biology of the Cell  
Garland Publishing, Inc., 2nd edition, 1989. ISBN: 0-8240-3695-6
59. Cameron IL, Kanal KM, Keener CR, Fullerton GD.: A mechanistic view of the non-ideal osmotic and motional behavior of intracellular water.  
Cell. Biol. Int. 1997;21:99e113.
60. Dodge JT, Mitchel M, Hanahan DJ.: The preparation and chemical characteristics of Hb-free ghosts of human erythrocytes.  
J. Biol. Chem. 1962;34:119e30.
61. Doi Edwards: The theory of polymer dynamics,  
Oxford Science Publication 1986.
62. Benga G, Borza T.: Diffusional water permeability of mammalian red blood cells. Comp Biochem Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 1995; 112:653e9.
63. Bogner P, Sipos K, Ludany A, Somogyi B, Miseta A.: Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes.  
Eur. Biophys. J. 2002;31:145e52.
64. Torres AM, Michniewicz RJ, Chapman BE, Young GA, Kuchel PW.: Characterisation of erythrocyte shapes and sizes by NMR diffusionediffraction of water: correlations with electron micrographs.  
J. Magn. Reson. Imaging 1998;16:423e34.
65. Cameron IL, Ord VA, Fullerton GD.: Water of hydration in the intra and extra-cellular environment of human erythrocytes.  
Biochem. Cell. Biol. 1988;66:1186e99.
66. Sotak, CH.: Nuclear magnetic resonance (NMR) measurement of the apparent diffusion coefficient (ADC) of tissue water and its relationship to cell volume changes in pathological states.  
Neurochem. Int. 2004; 45:569-82.
67. van Pul C, Jennekens W, Nicolay K, Kopinga K, Wijn PF.: Ischemia-induced ADC changes are larger than osmotically-induced ADC changes in a neonatal rat hippocampus model.  
Magn. Reson. Med. 2005; 53:348-55.
68. Duong TQ, Ackerman JJ, Ying HS, Neil JJ. Evaluation of extra- and intracellular apparent diffusion in normal and globally ischemic rat brain via <sup>19</sup>F NMR.  
Magn. Reson. Med. 1998 40: 1-13.

69. Shashoua VE.: Extracellular fluid proteins of goldfish brain: studies of concentration and labeling patterns.  
Neurochem. Res. 1981; 6: 1129-1147.
70. Maurer MH, Berger C, Wolf M, Futterer CD, Feldmann RE Jr, Schwab S, Kuschinsky W.: The proteome of human brain microdialysate.  
Proteome. Sci. 2003; 1: 1-7.
71. Sykova E.: Diffusion properties of the brain in health and disease.  
Neurochem. Int. 2004; 45: 453-66.
72. Krizaj D, Rice ME, Wardle RA, Nicholson C.: Water compartmentalization and extracellular tortuosity after osmotic changes in cerebellum of *Trachemys scripta*.  
J. Physiol. 1996; 492: 887-96.
73. Muir KW, Buchan A, von Kummer R, Rother J, Baron JC. Imaging of acute stroke.  
Lancet Neurol. 2006 5:755-768.
74. Calamante F, Lythgoe MF, Pell GS, Thomas DL, King MD, Busza AL, Sotak CH, Williams SR, Ordidge RJ, Gadian DG.: Early changes in water diffusion, perfusion, T1, and T2 during focal cerebral ischemia in the rat studied at 8.5 T.  
Magn. Reson. Med. 1999 41:479-85.
75. Dorsten FA, Olah L, Schwindt W, Grune M, Uhlenkuken U, Pillekamp F, Hossmann KA, Hoehn M.: Dynamic changes of ADC, perfusion, and NMR relaxation parameters in transient focal ischemia of rat brain.  
Magn. Reson. Med. 2002 47:97-104.
76. Schwarcz A, Bogner P, Meric P, Correze JL, Berente Z, Pal J, Gallyas F, Doczi T, Gillet B, Beloeil JC.: The existence of biexponential signal decay in magnetic resonance diffusion-weighted imaging appears to be independent of compartmentalization.  
Magn. Reson. Med. 2004 51:278-85.
77. Peter Bogner, Attila Miseta, Zoltan Berente, Attila Schwarcz, Gyula Kotek, Imre Repa: Osmotic and diffusive properties of intracellular water in camel erythrocytes: effect of hemoglobin crowdedness.  
Cell Biology International 2005 Sept., 29(9):731-6.
78. Gyula Kotek, Zoltán Berente, Attila Schwarcz, Zsolt Vajda, Janaki Hadjiev, Ildiko Horvath, Imre Repa, Attila Miseta, Peter Bogner: Effects of intra- and extracellular space properties on diffusion and T2 relaxation in a tissue model.  
MRI, 2008 Sept 1.
79. Kevin S. Lee, SherryFranko, Pete Vanderklisch, Amy Arai, Gary Lynch: Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia  
Proc. Nadl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, pp. 7233-7237, August 1991

## Összefoglaló

Vizsgálataink a stroke során felmerülő radiológiai probléma nyomán azt a célt tűzték ki, hogy ellenőrizhető modellkísérletekben a víz diffúziós tényezőjének és a T2 relaxációs időnek a kontrollálható paraméterektől való függését felderítsék. A vizsgálatok tárgyát kísérleti modell-oldatok, illetve sejtek szuszpenziói képezték. A kísérleti eredmények elméleti modellekkel vettem össze, ennek célja a következő volt: a) a modellek érvényességét tesztelni, b) a validált modellek alapján összetett rendszerekben bekövetkező diffúziós tényező és T2 relaxációs idő változásokat megjósolni, c) az MR mérések tér-, és időskáláját illetően koherens képet kialakítani, amely támpontot ad a diagnosztika szakemberei számára. Vizsgálataim középpontjában heterogén (intra-, és extracelluláris közeget is tartalmazó) rendszerek diffúziós és relaxációs tulajdonságai álltak. Az intra-, és extracelluláris tér oldott molekulái minőségének és mennyiségének hatását vizsgáltam.

### *Proteolízis modell kísérletek*

Egy homogén mintában a diffúziós és relaxációs tulajdonságokat a víz és az oldott anyag molekulái közötti kölcsönhatások határozzák meg. A molekuláris történések (proteinek degradálódása, polimerizációs folyamatok), valamint a koncentráció-változások egyszerre jelenhetnek meg élettani folyamatokban. E történések egymástól független hatásának vizsgálata állt a modell-kísérletek középpontjában.

### *Molekuláris crowding kísérletek*

A VVT fehérjeállománya 95%-ban hemoglobin. A különböző fajok hemoglobinja eltérő hidrofilitású aminosavakat tartalmaz. Az intracelluláris tér molekuláinak vízzel való kölcsönhatása fajonkénti különbözik. E kísérletek célja az extracelluláris tértől mentesnek mondható vörösvértest (VVT) masszák MR vizsgálatának és a minták ozmotikus viselkedésének összevetése volt. Az oldatkísérletekkel és a heterogén rendszereken végzett kísérletekkel való összehasonlításban a sejtfalak diffúziót gátló hatása meghatározható.

### *Intracelluláris (IC) és extracelluláris (EC) tér hatásának független vizsgálata*

Az IC és EC tér koncentrációjának és oldott molekulái minőségének hatását vizsgáltuk VVT szuszpenziókon. Az EC tér koncentrációjának és az oldott molekulák minőségének hatását, valamint az IC tér koncentrációjának hatását vizsgáltuk. Célul tűztük ki olyan elméleti modell kiválasztását, amely a kísérleti eredményeket helyesen írja le. Ezek a kísérletek vezetnek a szövetekben tapasztalt MR eredmények értelmezéséhez, a heterogén közegek MR mérések által meghatározott idő-, és térskálájú viselkedésének leírásához.

### *Intracelluláris tér módosulásának hatása*

A VVT szuszpenziók végzett kísérletek és elméleti modelljük rávilágítanak arra, hogy az in-vivo lezajló intracelluláris történéseket makroszkopikus voxelekben mért MR paraméterek alapján detektálni lehet. A sejtszuszenziókon végzett kísérletek célja felderíteni, az intracelluláris történések MR mérésekkel való detektálási lehetőségét. A Jurkat sejtek szuszpenzióján végzett kísérletek a számos kóros folyamatban (diabétesz, ischemia utáni reperfúzió, tumor genézis, apoptózis) megjelenő intracelluláris protein módosulás (O-glükolizáció) MR mérésekkel való detektálásának lehetőségét célozzák. A HeLa sejtek szuszpenzióján végzett kísérletek a sejtciklusok fázisainak MR mérésekkel való detektálásának lehetőségét célozzák. Ez utóbbi, további diagnosztikai eljárás alapkoncepciójának vizsgálata is egyben.

## **Módszerek**

### *MR technikák*

Az intracelluláris crowding kísérletek MR képalkotás módszerrel, az oldat-kísérletek, az EC/IC tér szerepét vizsgáló kísérletek, valamint az intracelluláris tér módosulásait vizsgáló kísérletek spektroszkópiai eljárással történtek. A kísérletek Varian<sup>UNITY</sup> INOVA 400 WB MR berendezésen történtek (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Az effektív diffúziós tényező meghatározása PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin Echo) szekvenciával, a T2 relaxáció meghatározása CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) szekvenciával, a T1 relaxációs érték meghatározása inverziós technikával történt. Az exponenciális jelcsökkenésekből a diffúziós tényező (ADC), T2 és T1 relaxációs idők a Varian utólagos adatfeldolgozó szoftvercsomag segítségével került meghatározásra.

### *Oldatkísérletek*

A proteolízis modell-kísérletekhez különböző molekulák oldatai készültek. Az oldott molekulák mérete hatásának vizsgálatához modell polimer PEG (Polietilén-glikol: HO-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-H ) oldatok, a biológiai polimerek vizsgálatához albumin és lizozim oldatok, a lizált fehérjék hatásának vizsgálatához pepton oldatok készültek.

### *VVT szuszpenziók*

Humán és teve vérmintákból származó eritrociták szuszpenziói szolgáltak a kísérletek alapjául. Az intracelluláris tér hatását ozmotikusan manipulált VVT szuszpenziókkal vizsgáltuk, illetve a különböző fajok VVT szuszpenziója tulajdonságainak összehasonlításával. Az extracelluláris tér hatását a szuszpenziós médiumokban oldott molekulák minőségének és mennyiségének változásán keresztül vizsgáltuk.



### *Intracelluláris módosulások*

Jurkat sejtek különböző médiumban való inkubálásával az O-glükolizáció egyensúlyát módosítottuk. Az intracelluláris térben glükolizált fehérjének felszaporodásának hatását vizsgáltuk, a sejtek 50%-os szuszpenzióján végzett MR kísérletekkel, a diffúziós tényező és a T2 relaxációs idő mérésével. HeLa sejtek szinkronizálását értük el timidin felhasználásával. A szinkronizált sejtpopuláció fázisaiban mért diffúziós és relaxációs idők kerültek összehasonlításra.

### *Heterogén rendszerek elméleti modellezése*

Összevetettük az effektív médium közelítés (EMT) eredményeit a VVT szuszpenziókon mért diffúziós kísérletek eredményeivel. Az EMT modellből származó - heterogén rendszer paramétereit tartalmazó - összefüggést átalakítottuk egy dimenzió nélküli, származtatott paraméterek közötti összefüggéssé, amelyben minden paraméter egyszerűen mérhető, azonban egymástól nem független. E dimenziótlan paraméterek közötti összefüggés és a kísérletek eredményeinek egyezését vizsgáltuk. A relaxáció meghatározására diffúzió-korrigált térfogati súlyozást alkalmaztunk, e modell érvényességi határait vizsgáltuk.

## **Eredmények**

### *Proteolízis modell – homogén biológiai modell*

Kísérleteim alapján, a mért diffúziós tényezővel (ADC) és a T2 relaxációs tényezővel kapcsolatban a következő megállapítások tehetők.

- Az ADC az oldott molekulák koncentrációjától függ elsősorban, az oldott molekulák tömege sokkal kisebb mértékben befolyásolja. A koncentráció tág tartományában az ADC függése a koncentrációtól lineáris. Az ADC a koncentrációváltozások jó indikátorának bizonyult, de az oldott molekulák tömegére és minőségére érzéketlen.
- Az oldott és oldószer molekulák diffúziója széles koncentráció-tartományban lineáris összefüggést mutat. A magasabb oldott anyag koncentrációk tartományában ettől eltérés figyelhető meg, az oldott molekulák kölcsönhatásának köszönhetően.
- A T2 relaxációs tényező a koncentráció tág tartományában független a koncentrációtól (biológiai molekulák esetén), az oldott molekulák tömegétől és minőségétől erős függést mutat. A T2 relaxációs idő a molekulák minőségének jó indikátora.
- Az ADC és a T2 változásai különböző élettani folyamatokhoz köthetők, a kísérletek a két mennyiség korrelálatlan változásának lehetséges magyarázatát adják:

- Az ischemia során fellépő folyamatok során az oldott molekulák spektrális összetételének megváltozása T2 változást idéz elő, feltételezhető tehát, hogy a megfigyelt T2 változások proteolitikus folyamatokat jeleznek.
- Feltételezhető továbbá, hogy az ischemia során megfigyelt ADC változás, a fellépő koncentráció-változások (ödéma) hatása.

Ezek az eredmények a Magyar Neuroradiológiai Társaság XIV. Kongresszusa és Továbbképző Kurzusa keretében és a CNS Injury és a Magyar Idegsebészeti Társaság XVII. Kongresszusa keretében megtartott előadásaim keretében kerültek közlésre (3. és 4. számú közlemény).

#### *Intracelluláris crowding*

A teve és humán eritrocitákon végzett kísérleteink összhangban vannak az oldatokon végzett diffúziós kísérletekkel. A különböző hemoglobin oldatok azonos koncentráció mellett, közel azonos diffúziós tulajdonsággal bírnak. A hemoglobin molekulák különböző hidrofilitása a diffúziós folyamatokat csak kis mértékben módosítja. A hemoglobin-koncentráció csökkenése a víz diffúziójának csökkenéséhez vezet. Az IC tér hidrofilitása csak közvetetten, a víztartalom változásán keresztül befolyásolja az ADC értékét.

A sejtfalak jelenléte az MR mérések paramétereinek e tartományában a mono-exponenciális jelcsökkenéstől való eltérésben nyilvánul meg, a koncentráció hatása a gyors és lassú módusokban egyaránt megjelenik. A kísérletek igazolják, hogy a módusok megjelenése nem mindig köthető fizikailag elkülönült tértartományok jelenlétéhez. Ezek az eredmények a Cell Biology International folyóiratban kerültek közlésre (2. számú közlemény).

#### *IC és EC tér független vizsgálata – heterogén biológiai rendszerek*

A kísérletek eredményeit az EMT modell megfelelően írja le. Az EMT modellben a relatív paraméterekre való áttérés rendkívül sikeresnek bizonyult, a kísérletek MR mérésekre és egyszerű tömeg-meghatározásra redukálódtak. A kísérleti eredmények, valamint az elméleti modell alapján a következő megállapítások tehetők a heterogén rendszerekre az intracelluláris tér térfogatfrakciójának széles tartományában (ezek az eredmények a Magnetic Resonance Imaging folyóiratban kerültek közlésre, ld. 1. számú közlemény):

- A mért diffúziós tényező nem függ az extracelluláris tér oldott molekuláinak minőségétől, az ADC értéke lineárisan függ az oldott molekulák koncentrációjától, az oldatkísérletek eredményeivel összhangban.
- Az intracelluláris tér víztartalma az ADC értékét az EMT modellel összhangban befolyásolja, aszimmetrikusan a hipo-, és hiperozmotikus tartományokban. Az

irodalomban tárgyalt mechanizmusokhoz képest ezt új érveléssel sikerült alátámasztani, valamint független vizsgálattal igazolni.

- A T2 relaxációs tényező az EC tér koncentrációjától tág tartományában független a koncentrációtól, az oldott molekulák tömegétől és minőségétől való függése elhanyagolható.
- A T2 relaxációs tényező az intracelluláris tér víztartalmától határozott függést mutat, a diffúzió-korrigált térfogati súlyozás modellje szerint. E modell az ergodikusnak tekinthető rendszerekben a térfogati súlyozástól eltérően helyesen írja le a heterogén rendszer T2 relaxációs idejének alakulását az intracelluláris térfogatfrakció változása függvényében.
- Az ischemia MR diagnosztikáját illetően a következő megállapítások tehetők:
  - Az extracelluláris tér változásai a vártnál kisebb relevanciával bírnak.
  - Megkérdőjelezhető, hogy a citotoxikus ödéma során fellépő sejtduzzadás ADC változáshoz vezet.
  - A hosszabb T2 relaxációs idők citotoxikus ödémára utalnak.

#### *Intracelluláris módosulások*

Az intracelluláris tér kóros és normális folyamatokban való megváltozását 50%-os sejtszuspenziókon diffúziós MR mérésekkel sikerült detektálnom. Az O-glükolizációs egyensúly eltolódását mesterségesen előidézve, az így megfigyelt ADC érték változása szignifikánsnak mutatkozott. Ugyanakkor nem mutatkozott szignifikáns változás a T2 értékben.

Egy szinkronizált populációban az intracelluláris tér változásai diffúziós MR mérésekkel detektálhatók. A kísérletek során a G2 fázis alatt szignifikáns ADC érték csökkenés figyelhető meg. A kísérletek érdekessége, hogy a várakozásokkal ellentétben a T2 értékekben nem következett be szignifikáns változás. Az eredmények közzlése folyamatban van.

#### *További kutatási lehetőségek*

Az elméleti modellek értékelése és a kísérleti eredmények további kutatási, és alkalmazási lehetőségeket vetnek fel.

- Ischemia hatásának vizsgálata sejtbioológiai modelleken és állatkísérletekben.
- Diffúzió Tenzor Képalgoritmus MR technikájának optimalizálása, mérési eredmények értelmezésének pontosítása.
- Kemoterápiában alkalmazott citotoxikus anyagok, sejtpopulációt szinkronizáló hatásának in-vivo, kvantitatív értékelése.

## Summary

Initially motivated by the evaluation problems of MRI findings related to stroke, the main goal of this study was to identify and quantify the relevant parameters and their role in influencing the apparent diffusion coefficient (ADC) and T2 relaxation time. The subject of the study consisted of model polymer solutions and cell suspensions. The goals of theoretical modeling of the experimental systems are the following: a) test the validity range of models; b) predict ADC and T2 changes based on validated models; c) build a coherent picture of time-, and length scale in order to support field radiologists. In the focus of the experiments were heterogeneous systems (consisting of intracellular and extracellular space as well), and their diffusion and relaxation parameters. The effect of the quality of the intra-, and extracellular space was investigated.

### *Proteolysis mode experiments*

The diffusion and relaxation properties of water in a homogenous sample are determined by the interactions between the solute and the solvent (water) molecules. Molecular events (protein degradation, polymerization), and concentration changes may occur simultaneously in physiological processes. The independent effect of these events are in the focus of these experiments.

### *Molecular crowding experiments*

The proteins in red blood cells (RBC) consist of 95% hemoglobin. Mammalian erythrocytes differ in the amount of their hydrophilic amino acids. Also the interaction between the water and their intracellular proteins are different. The goal of these experiments was to compare extracellular space-free RBC samples regarding their ADC and osmotic behavior. In comparison with the experimental results on the polymer solutions, the effect of the cell membrane in diffusion was to be evaluated.

### *Analysis of the effect of intracellular (IC) and extracellular(EC) space*

The effect of the EC and IC solute molecules in RBC samples was studied. The effect of systematically modified EC space concentration and the nature of EC space solute molecule, also the concentration of the IC space effects the diffusion and relaxation of the samples. The goal was to identify and apply a theoretical model that properly describes the experimental findings. These findings and their theoretical models yield plausible explanation of complex physiological processes in heterogeneous systems, on the time-, and length-scale of the MR experiments.

### *Modification of the intracellular space and its effects*

The experimental findings and theoretical models imply that in-vivo intracellular events can be indeed detected by macroscopic, voxel size MR imaging measurements. The experiments with cell-suspensions evaluate the feasibility of detection of intracellular events. Jurkat cell line was utilized in an experiment series, where O-glycolisation and its effect on diffusion and relaxation was studied. O-glycolisation modifies the intracellular proteins in several pathological processes: diabetes, tumor genesis, apoptosis, reperfusion following ischemia. Another experiment series was carried out on HeLa cell suspensions, where the cell population was synchronized by application of thymidine. These experiments aimed the feasibility of detection of cell cycle phases by MR diffusion and relaxation experiments. These latter experiments served as a proof of concept study for further diagnostic technique.

## **Methods**

### *MR techniques*

The intracellular crowding experiments were carried out by MR imaging technique, the effects of EC/IC space, intracellular modification and experiments on solutions were carried out by MR spectroscopy technique. All measurements were performed on a Varian UNITY INOVA 400 WB spectrometer (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA. ADC was measured by PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin Echo) sequence, T2 was measured by CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) sequence, T1 was measured inversion recovery sequence. ADC, T2, T1 was derived from exponential signal decay by linear fitting with Varian built-in post-processing software packages.

### *Experiments with solutions*

Aqueous solutions of various solutes were prepared for the proteolysis model experiments. To test the effect of weight of the solute molecules, PEG (Polyethylene-glycol: HO - (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub> - H) was used. To test the effect of the biological polymers, albumin and lysozyme was used. To test the effect of peptides of various sizes, peptone solutions were used.

### *RBC suspensions*

Human and camel erythrocytes and their suspensions were used in these experiments. The effect of the intracellular space was studied by osmotically altered RBC suspensions and also by comparison of RBC suspensions of various species. The effect of the extracellular space was tested by applying various suspension media, where solute concentration and the nature of solute molecules were systematically altered.

### *Intracellular modifications*

The dynamic equilibrium in O-glycolization of intracellular proteins was modified. The increased glycolized protein content was monitored, the diffusion and T2 relaxation properties of 50% suspension of the modified cells were determined in MR experiments. Synchronization of HeLa cells was achieved by application of thymidine. The diffusion and relaxation properties of suspension of HeLa cells in various cell cycle phases were compared.

#### *Theoretical modeling of heterogeneous systems*

The goal is to compare Effective Medium Theory (EMT) model and experimental findings. The relationship between the parameters of the heterogeneous system, derived from EMT, is rewritten in a relationship between relative parameters, where all parameters can be measured easily, although these parameters are not independent pair-wise. The coherence between experimental findings and this theoretical relationship between dimensionless parameters was investigated. Furthermore, for the interpretation of the behavior of T2 relaxation time, diffusion-corrected volume weighting was used, and its validity investigated.

## **Results**

#### *Proteolysis model – homogenous biological model*

Based on the experimental findings related to ADC and T2, the following statements can be made.

- ADC is influenced mainly by the concentration of the solute molecules, the molecular weight has little effect. In a wide range of the concentration, there is a linear relation between ADC and concentration. ADC proved to be a good indicator of concentration and a poor indicator of the solute molecular weight.
- In a wide range of concentration, there is a linear dependence between the diffusion coefficient of the solute and solvent molecules. In the higher regime of concentrations a deviation from linear behavior is observed. This deviation is explained by the interaction between solute molecules.
- In a wide range of concentration T2 relaxation time appears to be independent from concentration (emphasized in experiments with biologically relevant solute molecules). T2 appears to be strongly dependent on the solute molecular weight, also on the individual characteristics of solute molecules. T2 relaxation time proved to be a good indicator of the nature of the solute molecules.
- Changes in ADC and T2 can be related to physiological processes. A possible explanation is provided by the experimental findings for the uncorrelated behavior of these parameters:

- The processes involved in ischemia induce changes in the spectral (molar distribution of molecular weight) composition of solute molecules, thus inducing T2 changes. It can be rightly expected, that T2 changes reflect proteolytic processes.
- It can be further assumed, that changes in ADC reflect concentration changes (oedema).

These results were presented at “Magyar Neuroradiológiai Társaság XIV. Kongresszusa és Továbbképző Kurzusa” and “CNS Injury és a Magyar Idegsebészeti Társaság XVII. Kongresszusa” (see publication 3., 4.).

#### *Intracellular crowding*

The experiments on human and camel erythrocytes are in accordance with the diffusion experiments on polymer solutions. The diffusion coefficients of the various hemoglobin solutions are very close at the same concentration. The differences in hemoglobin hydrophilicity have little effect on the diffusion. The increase in hemoglobin concentration leads to the decrease of the water diffusion. The hydrophilicity of the IC space has effects on the ADC only indirectly, i.e. through the influence in the intracellular water content.

The effect of the cell membranes reveals in the non-mono-exponential signal decay in the MR diffusion experiment, the effect of concentration reveals both in the slow and the fast component. These experimental findings emphasize the fact, that emergence of modes in signal decay does not necessarily reflect the existence of physically separate compartments.

These results were published in Cell Biology International (see publication 2.).

#### *Independent analysis of IC and EC spaces – heterogeneous biological systems*

EMT proved to be a proper theoretical model. The derived, new relationship between dimensionless parameters proved to be a very useful evaluation tool, the experiments simplified to MR experiments and straightforward mass measurements. Based on the experimental findings and the theoretical modeling, the following statements can be made, valid in a wide range of the intracellular space volume fraction (these results were published in Magnetic Resonance Imaging, see publication 1.):

- The measured diffusion coefficient does not depend on the nature of the extracellular space solutes; ADC depends linearly on the EC solute concentration, in good accordance with the experiments on polymer solutions.
- The IC water content determines the ADC value of the sample, according to the EMT model. The dependence is asymmetric for the hypo-, and hyper-osmotic regimes. This

finding of other studies was supported by new argumentation, also independent experimental findings was achieved.

- In a wide range of the EC solute concentration, T2 relaxation time proved to be independent of concentration, also solute molecule weight was found to be irrelevant.
- T2 relaxation time proves to be strongly influenced by IC water content, in good accordance with the diffusion-corrected volume weighting. This model, in contrast to the simple volume weighting, describes the behavior of the T2 relaxation time as a function of the IC volume fraction. This model is valid for ergodic systems.
- Related to the MR diagnostics of ischemia, the following statements can be made:
  - The changes in the extracellular space are less relevant than expected.
  - It is questionable that the cell swelling, induced during cytotoxic oedema, will lead to changes in the ADC.
  - The longer T2 relaxation times refer to cytotoxic oedema.

#### *Intracellular modifications*

The detection of changes in intracellular properties - related to normal and pathological processes – proved to be feasible in 50% cell suspensions by MR measurements. The modified equilibrium in intracellular O-glycosylated protein content led to significant ADC changes. However, no T2 relaxation time change was observed.

Also the changes of the intracellular space during normal cell cycle phases were detected by MR diffusion measurements. Apparently no T2 changes followed in contrast with the expectations.

The publishing of the results is in progress.

#### *Future research opportunities*

The evaluation of theoretical models and experimental findings suggest further research and application opportunities.

- Study of the ischemic processes in cell-biological models and animal models,
- Optimizing Diffusion Tensor Imaging MR technique, further clarify interpretation methods,
- In-vivo, quantitative evaluation of cell-synchronizing effect of cytotoxic chemotherapy.